



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Facultad de Ciencias Agropecuarias
Posgrado en Bosques y Gestión Ambiental
Medellín

**Estrategias biotecnológicas para evaluar la presencia
de cromo en la generación de biosólidos seguros.
Posibles alternativas de bioremediación**

Biotechnological strategies to evaluate the presence of chromium
in the generation of safe biosolids: Possible bioremediation
alternatives

Juan Alberto Vélez Zuluaga
Tesis doctoral
2018

Estrategias biotecnológicas para evaluar la presencia de cromo en la generación de biosólidos seguros. Posibles alternativas de bioremediación

Juan Alberto Vélez Zuluaga

Proyecto de tesis doctoral
como requisito parcial para optar al título de
Doctor en Ecología

Director

Ph.D. Sergio Ordúz

Codirectores

MSc. Olga Inés Montoya C.

MSc. Orlando Simón Ruíz V.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Posgrado en Bosques y Gestión Ambiental
Medellín - 2018

A la memoria de mis padres.

Agradecimientos.

A Carmencita, mi esposa, por su paciencia y apoyo incondicional durante todos estos años de compañía, complicidad y aliento en ésta cruzada.

A María Claudia y Juan Esteban, mis hijos, fuente de inspiración inagotable de mis proyectos.

Al Profesor Sergio Ordúz, mi director, por su dedicación, esmero y comprensión no sólo desde lo académico y lo administrativo, sino desde lo humano y lo personal. Gracias Profesor!

A Olga Inés Montoya y Orlando Ruiz, codirectores, quienes dedicaron largas horas a revisar todos los hallazgos de laboratorio y resultados de campo para el avance y crecimiento del grupo y a planear estratégicamente cada una de las acciones a emprender para alcanzar nuestros cometidos.

A María Belén Turrión, mi directora en la estancia doctoral en la Universidad de Valladolid, quien me brindó todo su apoyo, para llevar a feliz término mi pasantía.

A los profesores Valentín Pando de la Uva y Guillermo Correa de la UNal, por su valiosa y definitiva contribución en los análisis estadísticos.

A Rafael Mulas y Francisco Lafuente, profesores de la Universidad de Valladolid por estar siempre atentos a cualquier apoyo que me pudiesen brindar.

A Felipe Bravo, Director del Instituto Universitario de Gestión Forestal Sostenible de la Universidad de Valladolid, por su invitación a realizar la pasantía doctoral en España.

Al profesor Luis Fernando Osorio, quien me abrió un lugar en el campus de la Yutera-Palencia-España y contribuyó notablemente para ayudarme a fortalecer mis relaciones interpersonales allí, y para que nunca me sintiera extranjero en ese lugar.

A David Llanos, Gerente de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) de León, por su dedicación y esmero para explicar el modelo de las estaciones depuradoras en España y por su compromiso con nuestro entendimiento.

A Marta Nelly Vargas, del Posgrado en Bosques y Conservación Ambiental, de la UNal en Medellín, por su incondicional e irrestricto apoyo, siempre atenta y siempre vigilante. Gracias Martica.

A Luisa Quiróz y Johan Bedoya, estudiantes de Maestría de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, por su acompañamiento y su aporte en mis ensayos de campo.

A Gustavo García, Director de biosólidos de la PTAR San Fernando por su paciencia y tolerancia, para leer y discutir mis reportes y por sus suministros oportunos de biosólidos.

A Camilo Ramírez, Walter Osorio, Natural Control y Soluciones Microbiales para el Trópico por su contribución con algunas cepas microbianas iniciales.

Al profesor Juan Carlos Pérez y a Daniel Pineda por sus invaluable aportes con el Rhizotron.

A Beatriz Trujillo, jefe y amiga, quien siempre creyó que esto podría ser posible y me apoyó.

A todos ellos, y quizás a unos cuantos nombres más que siempre se escapan, mi devoción, pues reconozco que un tradicional MUCHAS GRACIAS, sólo hará escasa justicia, por todo lo que me dieron a manos llenas.

Tabla de contenido

ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA EVALUAR LA PRESENCIA DE CROMO EN LA GENERACIÓN DE BIOSÓLIDOS SEGUROS. POSIBLES ALTERNATIVAS DE BIOREMEDIACIÓN.....	I
Lista de ilustraciones	VII
Lista de tablas.....	IX
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT	XIV
INTRODUCCIÓN.....	16
1. MARCO TEÓRICO	18
1.1. BIOSÓLIDOS	18
1.1.1 Patógenos	18
1.1.2 Sustancias químicas orgánicas	19
1.1.3 Metales pesados	19
1.1.3.1 Cromo	20
1.1.3.1.1 Cromo Trivalente	20
1.1.3.1.2 Cromo Hexavalente	21
1.2. OXIDO-REDUCCIÓN DE CROMO TRIVALENTE Y HEXAVALENTE	22
1.3. ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA GESTIÓN DE RESIDUOS	25
1.3.1 Bioremediación.....	25
1.3.2. Biotest	27
2. ANTECEDENTES Y RESULTADOS	29
2.1. CAPÍTULO A	30
COMPARAR LA CAPACIDAD PARA REMOVER O REDUCIR Cr^{6+} A Cr^{3+} DE MICROORGANISMOS NATIVOS Y EXÓGENOS , CULTIVADOS EN MEDIO MÍNIMO DE LEE (MML) MODIFICADO, ADICIONADO CON DOSIS CRECIENTES DE CROMO.....	30
2.1.1. RESUMEN.....	30
2.1.2. ESTADO DEL ARTE	30
2.1.3. OBJETIVOS	33
2.1.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.1.5. RESULTADOS.....	36
2.1.6. DISCUSIÓN	37
2.1.7. CONCLUSIÓN	40
2.2. CAPÍTULO B	41
HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA AISLAR, CULTIVAR Y CARACTERIZAR MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD PARA REMOVER CROMO	41
2.2.1. RESUMEN.....	41
2.2.2. ESTADO DEL ARTE	41
2.2.3. OBJETIVO	43
2.2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
2.2.5. RESULTADOS.....	45
2.2.6 DISCUSIÓN	61

2.2.7. CONCLUSIÓN	64
2.3. CAPÍTULO C.....	65
CAPACIDAD BIOLÓGICA PARA BIOREMEDIAR CROMO HEXAVALENTE <i>IN-SITU</i>	65
2.3.1. RESUMEN.....	65
2.3.2. ESTADO DEL ARTE	65
2.3.3. OBJETIVOS	66
2.3.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	66
2.3.5. RESULTADOS.....	69
2.3.6. DISCUSIÓN	84
2.3.7. CONCLUSIÓN	87
2.4. CAPÍTULO D	88
NEUTRALIZACIÓN DEL CROMO EN EL SUELO MEDIANTE EL USO DEL SILICATO DE MAGNESIO	88
2.4.1. RESUMEN.....	88
2.4.2. ESTADO DEL ARTE	88
2.4.3. OBJETIVOS	89
2.4.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	89
2.4.5. RESULTADOS.....	90
2.4.6. DISCUSIÓN	91
2.4.7. CONCLUSIÓN	92
2.5. CAPÍTULO E.....	93
NEUTRALIZACIÓN DE CROMO EN EL SUELO POR LA ACCIÓN COMBINADA DE MICROORGANISMOS Y SILICATO DE MAGNESIO	93
2.5.1. RESUMEN.....	93
2.5.2. ESTADO DEL ARTE	93
2.5.3. OBJETIVOS	94
2.5.4. METODOLOGÍA.....	95
2.5.5. RESULTADOS.....	98
2.5.6. DISCUSIÓN	106
3.0 CONCLUSIONES	108
4.0 RECOMENDACIONES PARA EPM.....	109
ANEXOS.....	111
REFERENCIAS	155

Lista de ilustraciones

ILUSTRACIÓN 1. TIPOS DE CONTAMINANTE MÁS FRECUENTES EN VERTEDEROS EN ESTADOS UNIDOS. ADAPTADO DE EPA 2002.....	20
ILUSTRACIÓN 2. DEMANDA DEL CONSUMO MUNDIAL DE CROMO POR TIPO DE INDUSTRIA (%) (ADAPTADO DE EPA 1997).	22
ILUSTRACIÓN 3. MÉTODOS DE PRETRATAMIENTOS USADOS PARA LA ESPECIACIÓN DE CROMO (ADAPTADO DE KUMRAL, 1997).	23
ILUSTRACIÓN 4. MECANISMOS DE INTERACCIÓN DE BIOMASA FÚNGICA LLEVADOS A CABO EN LA REMOCIÓN DEL CROMO. (GUTIÉRREZ CORONA ET AL., 2010)	32
ILUSTRACIÓN 5. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE AGUAS RESIDUALES CON PRESENCIA DE CROMO. CURTIEMBRES ITAGÜÍ.	34
ILUSTRACIÓN 6. CEPA DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> EVALUADA POR SU CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE CROMO.	35
ILUSTRACIÓN 7. INCUBACIÓN DE BACTERIAS AISLADAS DE AGUAS DE CURTIEMBRES EN MEDIO MÍNIMO DE LEE A 100 RPM Y 28°C.	35
ILUSTRACIÓN 8. (IZQ.) REDUCCIÓN DE Cr ⁶⁺ PPM (EJE Y) POR MICROORGANISMO BS : BASILLUS, BIOTIPOS BACTERIALE ETCR10 Y CC13. PS: <i>PAECILOMYCES</i> . RH: <i>RHIZOBIUM</i> PARA DOSIS DESDE 0-2000 PPM DE Cr ⁶⁺ . (DERECHA). PRUEBA DE NORMALIDAD Q-Q PLOT PROGRAMA R 5.3.1	39
ILUSTRACIÓN 9. MORFOLOGÍA DE LOS HONGOS CON MAYOR POTENCIAL PARA REMOVER Cr ⁶⁺ (1)	47
ILUSTRACIÓN 10. MORFOLOGÍA HONGOS CON MAYOR POTENCIAL PARA REMOVER Cr ⁶⁺ CRECIENDO EN AUSENCIA DEL METAL (1).	47
ILUSTRACIÓN 11. MORFOLOGÍA DE LOS HONGOS CON MAYOR POTENCIAL PARA REMOVER Cr ⁶⁺ (2).	48
ILUSTRACIÓN 12. MORFOLOGÍA HONGOS CON MAYOR POTENCIAL PARA REMOVER Cr ⁶⁺ CRECIENDO EN AUSENCIA DEL METAL (2).	48
ILUSTRACIÓN 13. BACTERIAS CON POTENCIAL PARA REMOVER Cr ⁶⁺ AISLADAS DE BIOSÓLIDOS PTAR SAN FERNANDO.....	49
ILUSTRACIÓN 14. MUESTRAS DE HONGOS PARA SECUENCIAMIENTO.....	50
ILUSTRACIÓN 15. RESULTADO DE LA PCR MUESTRA 5001.	50
ILUSTRACIÓN 16. RESULTADO DE LA PCR MUESTRAS [1] 4002, [2] 8001, [3] 8002.....	53
ILUSTRACIÓN 17. CROMATOGRAMA MUESTRA 4002 . EJE X POSICIÓN DE CADA BASE EN LA SECUENCIA OBTENIDA, EJE Y CALIDAD DEL SECUENCIAMIENTO PARA CADA BASE, LA CALIDAD PROMEDIO DE LAS SECUENCIAS PARA LA MUESTRA 4002 FUE DE 47.2.....	53
ILUSTRACIÓN 18. CROMATOGRAMA MUESTRA 8002. EJE X POSICIÓN DE CADA BASE EN LA SECUENCIA OBTENIDA, EJE Y CALIDAD DEL SECUENCIAMIENTO PARA CADA BASE, LA CALIDAD PROMEDIO DE LAS SECUENCIAS PARA LA MUESTRA 8002 FUE DE 44.9.....	53
ILUSTRACIÓN 19. PRUEBAS AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO PARA OBSERVAR LA PRESENCIA DE Cr ⁶⁺ Y Cr ³⁺ EN <i>STAPHYLOCOCCUS</i> Y <i>BACILLUS</i> . IMÁGENES A HASTA N CON CONTENIDOS DE CROMO POR DEBAJO DEL 0,2 % DEL PESO DE LA MUESTRA, REQUIRIDO PARA DETECCIÓN DEL EQUIPO. IMEAGENES O HASTA AB, CON CONTENIDOS DE CROMO SUPERIORES AL 0.2 % DEL PESO TOTAL DE LA MUESTRA.....	61
ILUSTRACIÓN 20. LLENADO DE MACETAS CON RIZOPOT CENTRAL PARA SEPARAR SUELO RIZOSFÉRICO.....	67
ILUSTRACIÓN 21. CALIBRACIÓN DE LA PRUEBA DE COLOR LILA A 540 NM, QUE CONFIRMA LA PRESENCIA DE Cr ⁶⁺ CON ADICIONES CRECIENTES DE 50 µL. EN 0,1,2, LA CONCENTRACIÓN ES TAN BAJA QUE NO REFLEJA EL COLOR.	68
ILUSTRACIÓN 22. FRIJOL 4 SEMANAS DE SEMBRADO, CRECIMIENTO SOBRE INCEPTISOL NO RIZOSFÉRICO.....	69
ILUSTRACIÓN 23. ELEMENTOS DEL TESTS DE NORMALIDAD PROGRAMA SAS, PROCEDIMIENTO MIXED RESIDUALES DE STUDENT PARA Cr ⁶⁺ CORRIDO SOBRE LOS DATOS DE LAS TABLAS 15 Y 16.....	73
ILUSTRACIÓN 24. PROCEDIMIENTO GENMOD PARA CONFIRMAR SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA DE LOS EFECTOS PRINCIPALES E INTERACCIONES. VARIABLE DEPENDIENTE CROMO TOTAL A: SUELO ; B: CROMO ; C:	

SUELO*CROMO ; D: BIOSÓLIDO*CROMO ; VARIABLE Cr ⁶⁺ PLASMA E: SUELO ; F : RIZOFERA ; G: CROMO ; H: SUELO*CROMO; I: BIOSÓLIDO*CROMO; J: RIZOSFERA*MICROORGANISMOS.	75
ILUSTRACIÓN 25. GEL DE AGAROSA. CONTROL DE AMPLIFICACIÓN.	81
ILUSTRACIÓN 26. COMPARACIÓN A NIVEL DE CATEGORÍA TAXONÓMICA A PHYL, B CLASE ; c ORDEN, D FAMILIA Y E GÉNERO DE LOS GRUPOS MÁS ABUNDANTES ENCONTRADOS EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS.....	84
ILUSTRACIÓN 27. EFECTO DEL SILICATO DE MAGNESIO SOBRE LA ADSORCIÓN DE ALGUNOS METALES (ARSÉNICO, CADMIO,CROMO Y PLOMO PRESENTES EN EL BIOSÓLIDO DE LA PTAR SAN FERNANDO.	91
ILUSTRACIÓN 28. MODELO DE RHIZOTRON DE UN SOLO CUERPO Y DETALLE DE LA SIEMBRA.	95
ILUSTRACIÓN 29. ENSAYO No.1 CRECIMIENTO DE RAÍZ Y ALTURA DE <i>L. CULINARIS</i> , EN PRESENCIA DE Cr ⁶⁺ Y LOS MICROORGANISMOS <i>OCHROBACTRUM ANTHROPI</i> Y <i>TRICHODERMA SP.</i>	98
ILUSTRACIÓN 30. ENSAYO No.2 EFECTO DEL Cr ⁶⁺ EN EL CRECIMIENTO DE <i>L. CULINARIS</i> , EN SUELOS DE TIPO ANDISOL E INCEPTISOL EN PRESENCIA DE SILICATO DE Mg Y LOS MICROORGANISMOS <i>OCHROBACTRUM ANTHROPI</i> , <i>BACILLUS CEREUS</i> , <i>SCEDOSPORIUM DEHOOGII</i> Y <i>TRICHODERMA SP.</i>	100
ILUSTRACIÓN 31. ENSAYO No.2 CRECIMIENTO PARTE AÉREA DE <i>L. CULINARIS</i> EN PERSENCIA DE Cr ⁶⁺ , SILICATO DE MAGNESIO Y <i>OCHROBACTRUM</i> , <i>TRICHODERMA</i> , <i>SCEDOSPORIUM</i> Y <i>BACILLUS</i> . TRATAMIENTOS 1 2 Y 3 ..	101
ILUSTRACIÓN 32. ENSAYO No.2 CRECIMIENTO PARTE AÉREA DE <i>L. CULINARIS</i> EN PERSENCIA DE Cr ⁶⁺ , SILICATO DE MAGNESIO Y <i>OCHROBACTRUM</i> , <i>TRICHODERMA</i> , <i>SCEDOSPORIUM</i> Y <i>BACILLUS</i> . TRATAMIENTO 4 Y COMPARATIVOS DE TRATAMIENTOS 1 vs 2 Y 3 vs 4.	101
ILUSTRACIÓN 33. ENSAYO No.2 CRECIMIENTO RAÍZ DE <i>L. CULINARIS</i> EN PERSENCIA DE Cr ⁶⁺ , SILICATO DE MAGNESIO Y <i>OCHROBACTRUM</i> , <i>TRICHODERMA</i> , <i>SCEDOSPORIUM</i> Y <i>BACILLUS</i>	102
ILUSTRACIÓN 34. CRECIMIENTO DE RAÍZ Y ALTURA DE <i>L. CULINARIS</i> , EN PRESENCIA DE Cr ⁶⁺ , BIOSÓLIDOS, SILICATO DE MAGNESIO Y LOS MICROORGANISMOS <i>OCHROBACTRUM ANTHROPI</i> , <i>BACILLUS CEREUS</i> , <i>SCEDOSPORIUM DEHOOGII</i> , <i>TRICHODERMA SP.</i>	103
ILUSTRACIÓN 35. ENSAYO No.3. CRECIMIENTO RAÍZ Y PARTE AÉREA DE <i>L. CULINARIS</i> EN PERSENCIA DE Cr ⁶⁺ , BIOSÓLIDO, SILICATO DE MAGNESIO, Y <i>OCHROBACTRUM</i> , <i>TRICHODERMA</i> , <i>SCEDOSPORIUM</i> Y <i>BACILLUS</i>	104
ILUSTRACIÓN 36. ENSAYO No.3. COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS CRECIMIENTO RAÍZ Y ALTURA DE <i>L. CULINARIS</i> EN PRESENCIA DE Cr ⁶⁺ , BIOSÓLIDO, SILICATO DE MAGNESIO Y <i>OCHROBACTRUM</i> , <i>TRICHODERMA</i> <i>SCEDOSPORIUM</i> Y <i>BACILLUS</i>	105

Lista de tablas

TABLA 1. PRINCIPALES GÉNEROS CON POTENCIAL BIOREMEDIADOR DE METALES PESADOS (Cd, Cr Y Hg) EVALUADOS POR DIVERSOS AUTORES.	26
TABLA 2. REDUCCIÓN DE Cr ⁶⁺ A Cr ³⁺ POR <i>BACILLUS</i> , <i>RHIZOBIUM</i> , <i>PAECILOMYCES</i> Y LOS ESPORULADOS BACTERIANOS ETCR 10 Y CC13.*	37
TABLA 3. ESPECIES MICROBIANAS CON POTENCIAL REMEDIADOR DE CROMO EXPLORADOS EN LA ÚLTIMA DÉCADA POR VARIOS AUTORES EN DIFERENTES PAÍSES.	42
TABLA 4. HONGOS AISLADOS DE BIOSÓLIDOS PTAR SAN FERNANDO Y PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE Cr ⁶⁺	46
TABLA 5. BACTERIAS AISLADAS DE BIOSÓLIDOS PTAR SAN FERNANDO Y % DE REDUCCIÓN DE Cr ⁶⁺	49
TABLA 6. CONCENTRACIÓN DEL DNA MUESTRA 5001.	50
TABLA 7. CLASIFICACIÓN MUESTRA 5001 MEJOR RESULTADO.	51
TABLA 8. MUESTRA 5001 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.	51
TABLA 9. CONCENTRACIÓN DEL DNA MUESTRAS 4002, 8001 Y 8002.	52
TABLA 10. CLASIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS 4002 Y 8002, MEJOR RESULTADO.	54
TABLA 11. MUESTRAS 4002 Y 8002 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.	54
TABLA 12. MATRIZ DE DISTANCIA MUESTRAS 4002 Y 8002.	55
TABLA 13. DETALLE DE LOS PRINCIPALES GÉNEROS BACTERIALES CARACTERIZADOS BIOQUÍMICAMENTE MEDIANTE EL PROTOCOLO API MÉTODO 50CHB V4.	56
TABLA 14. HONGOS Y BACTERIAS CARACTERIZADOS POR DIFERENTES MÉTODOS Y PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE CROMO A LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.	62
TABLA 15. PORCENTAJE DE Cr ⁶⁺ EN SUELO ANDISOL (A) RIZOSFÉRICO Y NO RIZOSFÉRICO, CON 2 NIVELES DE BIOSÓLIDO , 2 NIVELES DE CROMO Y 2 NIVELES DE MICROORGANISMOS (*).	70
TABLA 16. PORCENTAJE DE Cr ⁶⁺ EN SUELO INCEPTISOL (I) RIZOSFÉRICO Y NO RIZOSFÉRICO, CON 2 NIVELES DE BIOSÓLIDO , 2 NIVELES DE CROMO Y 2 NIVELES DE MICROORGANISMOS (*).	71
TABLA 17. TEST PARA NORMALIDAD. KOLMOGOROV-SMIRNOV	72
TABLA 18. TEST TIPO 3 DE EFECTOS FIJOS PROGRAMA SAS, PROCEDIMIENTO MIXED, CORRIDO SOBRE LOS DATOS DE LAS TABLAS 15 Y 16. VARIABLE EVALUADA % Cr ⁶⁺ . GRADOS DE LIBERTAD, VALOR Y PROBABILIDAD DE F.	72
TABLA 19. PROMEDIOS DE MÍNIMOS CUADRADOS PARA EFECTOS PRINCIPALES E INTERACCIONES DOBLES PROGRAMA SAS, PROCEDIMIENTO MIXED DATOS PROCESADOS DE LAS TABLAS 15 Y 16.	74
TABLA 20. PROMEDIOS DE MÍNIMOS CUADRADOS PARA VALORES DE Cr ⁶⁺ EN LAS TABLAS 15 Y 16 CORRESPONDIENTES AL TIPO DE SUELO, NIVEL DE CROMO Y BIOSÓLIDO ADICIONADO Y PARA LAS INTERACCIONES SU*Cr Y BI*Cr. VARIABLE ANALIZADA CROMO TOTAL.	76
TABLA 21. MEDIAS DE MÍNIMOS CUADRADOS PROGRAMA SAS PROCEDIMIENTO MIXED SOBRE DATOS PRESENTADOS EN LAS TABLAS 15 Y 16 CORRESPONDIENTES AL TIPO DE SUELO (ANDISOL E INCEPTISOL), CROMO ADICIONADO (0 Y 2400 PPM DE Cr ⁶⁺), SUELO RIZOSFÉRICO Y NO RIZOSFÉRICO, INTERACCIÓN SU*Cr , INTERACCIÓN BI*Cr E INTERACCIÓN RI*MI. VARIABLE DEPENDIENTE Cr ⁶⁺ . PLASMA.	77
TABLA 22. DIFERENCIAS DE MEDIAS DE MÍNIMOS CUADRADOS, PROGRAMA SAS PROCEDIMIENTO MIXED SOBRE DATOS PRESENTADOS EN LAS TABLAS 15 Y 16 CORRESPONDIENTES AL TIPO DE SUELO (ANDISOL E INCEPTISOL), CROMO ADICIONADO (0 Y 2400 PPM DE Cr ⁶⁺), INTERACCIÓN SU*Cr E INTERACCIÓN BI*Cr. VARIABLE DEPENDIENTE CROMO TOTAL.	78
TABLA 23. DIFERENCIAS DE MEDIAS DE MÍNIMOS CUADRADOS PROGRAMA SAS PROCEDIMIENTO MIXED SOBRE DATOS PRESENTADOS EN LAS TABLAS 15 Y 16 CORRESPONDIENTES AL TIPO DE SUELO (ANDISOL E INCEPTISOL), CROMO ADICIONADO (0 Y 2400 PPM DE Cr ⁶⁺), SUELO RIZOSFÉRICO Y NO RIZOSFÉRICO, INTERACCIÓN SU*Cr , INTERACCIÓN BI*Cr E INTERACCIÓN RI*MI. VARIABLE EVALUADA Cr ⁶⁺ . PLASMA.	79
TABLA 24. SECUENCIAMIENTO GEN RIBOSOMAL 16S (REGIÓN VARIABLE V3-V4). 12 TRATAMIENTOS DE SUELOS RIZOSFÉRICOS ANDISOL E INCEPTISOL CON ADICIÓN DE <i>OCHROBACTRUM</i> Y <i>BACILLUS</i>	80

TABLA 25. MUESTRAS CORRESPONDIENTES A 12 TRATAMIENTOS DE SUELOS RIZOSFÉRICOS ANDISOL E INCEPTISOL CON ADICIÓN DE <i>OCHROBACTRUM</i> Y <i>BACILLUS</i>	80
TABLA 26. RESULTADOS DEL SECUENCIAMIENTO PROFUNDO DE LAS 12 LIBRERÍAS CORRESPONDIENTES A SUELOS RIZOSFÉRICOS ANDISOL E INCEPTISOL CON ADICIÓN DE <i>OCHROBACTRUM</i> Y <i>BACILLUS</i>	81
TABLA 27. SECUENCIAS DEPURADAS POR LIBRERÍA DE 12 MUESTRAS EVALUADAS PARA METADIVERSIDAD BACTERIANA CORRESPONDIENTES A SUELOS RIZOSFÉRICOS ANDISOL E INCEPTISOL CON ADICIÓN DE <i>OCHROBACTRUM</i> Y <i>BACILLUS</i>	82
TABLA 28. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD DE LOS OTUs AL 3%. RESULTADOS DE ANÁLISIS DE DIVERSIDAD ALFA OBTENIDOS CON EL PROGRAMA MOTHUR CORRESPONDIENTES A SUELOS RIZOSFÉRICOS ANDISOL E INCEPTISOL CON ADICIÓN DE <i>OCHROBACTRUM</i> Y <i>BACILLUS</i>	82
TABLA 29. NEUTRALIZACIÓN DE ALGUNOS METALES PESADOS POR EFECTO DEL SILICATO DE MAGNESIO ADICIONADO AL BIOSÓLIDO. DETERMINACIÓN POR EMISIÓN ATÓMICA.....	90
TABLA 30. PESO DEL SUELO Y VOLUMEN DE SOLUCIÓN DE DICROMATO DE POTASIO COMO FUENTE DE Cr ⁶⁺ USADO EN CADA UNO DE LOS RHIZOTRONES.....	96
TABLA 31. ENSAYO No.1 DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y PROMEDIOS DE CRECIMIENTO DE RAÍZ Y ALTURA DE <i>L. CULINARIS</i> , EN PRESENCIA DE Cr ⁶⁺ Y LOS MICROORGANISMOS <i>OCHROBACTRUM ANTHROPI</i> Y <i>TRICHODERMA</i> SP.	98
TABLA 32 ENSAYO No.2. DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y PROMEDIOS DE CRECIMIENTO DE RAÍZ Y ALTURA DE <i>L. CULINARIS</i> EN PRESENCIA DE Cr ⁶⁺ , SILICATO DE MAGNESIO Y LOS MICROORGANISMOS <i>OCHROBACTRUM ANTHROPI</i> , <i>BACILLUS CEREUS</i> , <i>SCEDOSPORIUM DEHOOGII</i> , <i>TRICHODERMA</i> SP.....	99
TABLA 33. ENSAYO No. 3 DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y PROMEDIOS DE CRECIMIENTO DE RAÍZ Y ALTURA DE <i>L. CULINARIS</i> , EN PRESENCIA DE Cr ⁶⁺ , BIOSÓLIDOS, SILICATO DE MAGNESIO Y LOS MICROORGANISMOS <i>OCHROBACTRUM ANTHROPI</i> , <i>BACILLUS CEREUS</i> , <i>SCEDOSPORIUM DEHOOGII</i> Y <i>TRICHODERMA</i> SP.	103

*Poca ciencia nos aparta de Dios,
Mucha nos acerca.*
Louis Pasteur

RESUMEN

La producción de biosólidos en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) San Fernando de propiedad de Empresas Públicas de Medellín (EPM) en Medellín, Antioquia, Colombia, está regulada por el Ministerio de Medio Ambiente Colombiano y custodiada por la autoridad regional ambiental Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia (Corantioquia). Uno de los metales más cuestionados y vigilados en la producción de biosólidos en el mundo es el cromo derivado de múltiples actividades antrópicas, cuyas formas más significativas son la especie hexavalente (Cr^{6+}) conocida por sus propiedades ácidas de naturaleza oxidante, que ocasiona daño a los tejidos y lesiones en los órganos, generando serios trastornos en la salud humana y animal con efectos mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos y la especie trivalente (Cr^{3+}), considerada vital y necesaria para la síntesis de la glucosa, algunos lípidos y proteínas. Las posibilidades de oxidoreducción entre estas dos especies son motivo de serias discusiones y múltiples investigaciones, pero todavía son inciertos algunos de los mecanismos que influyen y gobiernan estas reacciones de doble vía.

Cinco experimentos fueron llevados a cabo en la Universidad Nacional de Medellín tendientes a encontrar hongos y bacterias que fuesen capaces de crecer en medios de cultivo enriquecidos con cromo, con el objeto de aislarlos, purificarlos y multiplicarlos; para someterlos a concentraciones crecientes del metal, hasta encontrar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), con el objeto de ser utilizados posteriormente como posibles alternativas biotecnológicas en la remediación de ambientes con presencia de cromo.

Los microorganismos fueron obtenidos mediante aislados de aguas residuales de la empresa Curtiembres de Itagüí, Antioquia y de los biosólidos de la PTAR San Fernando, de los ceparios de la Universidad Nacional y de la Universidad de Antioquia, aportes de las empresas privadas Natural Control y Soluciones Microbiales para el Trópico; también se recurrió al interior del laboratorio a contaminantes ambientales colonizadores de un medio de cultivo enriquecido con cromo y fueron evaluados algunos fitopatógenos aleatorios obtenidos del cultivo del cacao.

Aquellos organismos seleccionados por su cromotolerancia, fueron evaluados en forma de consorcio microbial bajo invernadero, en macetas plásticas de 2 kilogramos de peso, con suelos contrastantes (Andisol e Inceptisol) y adiciones de biosólidos (20 Ton Ha^{-1}) de la PTAR San Fernando, en presencia de una dosis alta de dicromato de potasio equivalente al doble de la CMI explorada (2.400 mg kg^{-1}). Como planta bioindicadora se utilizó frijol arbustivo *Phaseolus vulgaris* durante todo el período vegetativo y reproductivo por 4 meses al cabo de los cuales se tomaron muestras de suelo rizosférico y no rizosférico con el propósito de llevar a cabo pruebas de metagenómica para rastrear la trazabilidad de las especies adicionadas y observar potenciales géneros nuevos que no hayan sido investigados.

Los microorganismos que demostraron mayor potencial por su capacidad para remover cromo total o reducir cromo hexavalente a trivalente fueron caracterizados molecularmente en la Universidad de Antioquia y bioquímicamente en la Universidad Nacional, sede de Medellín mediante el empleo del Kit API y del sistema Biolog Microstation ID System. Posteriormente purificados y escalados y previa confrontación con los hallazgos de otros investigadores a nivel global, fueron empleados en pruebas de biotest de toxicidad, para confirmar su capacidad remediadora en presencia de silicato de magnesio y en ausencia de él como posible agente neutralizador del cromo en el suelo, usando prototipos no comerciales de Rhizotrones como herramientas de diagnóstico. Plantas de lechuga *Lactuca sativa* y lenteja *Lens culinaris* fueron empleadas como biosensores por su alta sensibilidad a los metales traza.

Finalmente las bacterias *Ochrobactrum anthropi*, *O. intermedium*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. firmus*; *Staphylococcus saprophyticus* y los hongos *Scedosporium dehoogii*, *S. boydii*, *Paecilomyces lilacinus* y *Trichoderma* sp., fueron elegidos

como los organismos con mayor potencial para ser usados como bioremediadores de ambientes con presencia de cromo mediante la utilización de un biofiltro a través de un consorcio microbial, o de manera individual empleados *in situ*, en combinación con correctivos que contengan silicatos de magnesio, dado su poder neutralizador de cromo en el suelo, como fue demostrado en este estudio.

Palabras Claves: Biosólidos, Bioremediación, Cromo hexavalente, Oxido-Reducción, Bacterias remediadoras, Rhizotron.

ABSTRACT

The biosolid production in the water treatment plant (PTAR) San Fernando property of EPM de Medellin is regulated by the environment minister of Colombia and monitored by the regional environment authority Corantioquia. One of the most questioned and guarded metals in the production of biosolids is Chrome. This metal originates in several anthropic activities and has as its most representative forms the hexavalent (Cr^{6+}) species. This form is known for its acidic properties and oxidant nature, it produces damage to tissues and organ injuries generating serious disorders in human and animal health that include mutagenic, teratogenic and carcinogenic effects. The trivalent species (Cr^{3+}) is considered vital and necessary for the synthesis of glucose, and some lipids and proteins. The possibilities of oxide reduction between these two species are object of serious discussions and multiple researches but the mechanisms that govern and influentiate these double way reactions are still uncertain.

Five experiments were made in the Universidad Nacional de Medellin aiming to find fungus and bacteria that were able to grow in chrome enriched environment with the objective of isolate, purify and multiply them. Then they would be exposed to incremental concentration of the metal until finding the minimum inhibitory concentration (CMI), with the objective of using them in possible biotechnological alternatives aiming to remediate environments with chrome presence.

The microorganisms were obtained by isolating samples from the company Curtiembres de Itagui and from the Biosolids of the PTAR San Fernando property of Empresas Públicas de Medellín (EPM), borrowings from the stumps of Universidad Nacional and Universidad de Antioquia, contributions from the private companies Natural Control and Soluciones Microbiales para el Tropico, environmental colonizer contaminants to the chrome enriched media where also used and some phytopathogens obtained randomly from cacao plantations where also evaluated. The microorganisms selected due to their chrome tolerance were exposed to react under a greenhouse microbiological consortium in plastic pots weighing 2kg. Contrasting soils (Andisol and Inceptisol) and added biosolids (20 Ton Ha^{-1}) of the PTAR San Fernando in presence of a high dose of potassium dichromate equivalent to double of the explored CMI (2.400 mg kg^{-1}). The arbustive bean *Phaseolus vulgaris* was used as a bioindicator, the whole vegetative and reproductive period was followed for a period of 4 months during which samples of rizospheric and non rizospheric soil were taken with the purpose of developing metagenomics tests keeping track of the traceability of the added genera and observe potential new genera that haven't been investigated.

The microorganism that demonstrated a higher potential based on their capacity to remove total chrome, reduce hexavalent chrome to trivalent were characterized molecularly at the Universidad de Antioquia and biochemically at the Universidad Nacional using the API protocol and Biolog Microstation ID System. After a confrontation against other researchers at a global level the microorganisms were purified and escalated and then used in bio toxicity tests in order to confirm their corrective capacity in presence and absence of magnesium silicate as a possible neutralizing agent of Chrome in the soil, non-commercial prototypes of Rhizotrones were used to as diagnostic tools. Lettuce *Lactuca sativa* and lentil *Lens culinaris* were used as biosensors due to their high sensitivity to trace metals.

Finally the bacteria *Ochrobactrum anthropi*, *O. intermedium*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. firmus*; *Staphylococcus saprophyticus* and fungus *Scedosporium dehoogii*, *S. boydii*, *Paecilomyces lilacinus* y *Trichoderma* sp. Were selected as the microorganisms with the highest potential to be used as bio-remediating agents for environments with chrome presence

using them as a biofilter in a microbial consortium or in a individual way using them *in situ* in combination with correctives containing magnesium silicates due to its chrome neutralizing capacity as shown in this study.

Key Words: Biosolids, Bioremediation, Hexavalent Chromium, Oxide-Reduction, Remedial Bacteria, Rhizotron.

INTRODUCCIÓN

En la mayoría de los países, la revalorización de los recursos naturales ha resultado en un aumento de la presión regulatoria y en el incremento de la legislación ambiental. Paralelamente se han desarrollado tecnologías de monitoreo que permiten identificar con certeza y precisión los focos de contaminación. Particular importancia revisten los metales pesados sobre los que rige un marco regulatorio cada vez más estricto. Dentro de ellos, el cromo ocupa un lugar de relevancia en la legislación doméstica de cada país que impone la búsqueda de soluciones inteligentes y ecoeficientes, para la industria que recurre a éste insumo como materia prima de sus procesos de manufactura.

En la última década, la ciudad de Medellín-Colombia ha atravesado por una problemática particular en relación con los biosólidos que se generan diariamente en la PTAR San Fernando, que aunque no presentan niveles altos de metales pesados, dada la característica del parque industrial que los contiene, han registrado niveles de cromo variables a lo largo del año, asociados a la industria del cuero en ésta ciudad.

Las mediciones de las concentraciones químicas en las PTARs o en las estaciones depuradoras, deben arrojar información directa y de preferencia en tiempo real, sobre la inocuidad o la toxicidad del producto a evacuar, garantizando la sostenibilidad y respondiendo oportuna y sistemáticamente por la certificación de la calidad ambiental, para tranquilidad de la comunidad y en beneficio de la salud pública y del ecosistema.

Las investigaciones precedentes lideradas y auspiciadas por EPM en coordinación con las diferentes universidades del país, así como las medidas implementadas para asegurar la calidad de sus biosólidos, revelaron en el pasado niveles de cromo total (Cr^{+3} y Cr^{+6}) que justificaron avanzar en este estudio.

Tales niveles han señalado que aproximadamente el 99.9 % p/v del cromo es de la especie Cr^{+3} y que menos del 0.1 % es Cr^{+6} . Ésta investigación evaluó los efectos biodepresivos que dicha forma de cromo pudiera tener sobre los organismos bioindicadores de alta sensibilidad cuando son sometidos a su exposición. Sin embargo la evaluación del contenido de cromo de cualquier efluente, debe involucrar el cromo total, es decir, tanto el hexavalente, nocivo para la salud animal, como el trivalente, considerado vital.

En el pasado, el contenido de cromo de la PTAR San Fernando alcanzó niveles mensuales cercanos a 1000 mg Kg^{-1} , inferiores a la norma colombiana. Con estos contenidos se inició este estudio en el 2014. Ésta situación cambió durante la ejecución de la investigación; la empresa Curtiembres de Itagüí se retiró del polígono industrial, con lo cual los niveles alcanzados se redujeron drásticamente a valores cercanos a 150 mg Kg^{-1} y a su vez el ministerio medioambiental, amplió la norma y flexibilizó su posición para el contenido de cromo en la generación de biosólidos en Colombia.

La biotecnología, las técnicas en genómica y la biología molecular al servicio de la caracterización de los organismos desconocidos, así como los progresos en las telecomunicaciones, han permitido que investigadores dispersos por todo el globo, trabajando con

propósitos afines, avancen de manera vertiginosa en la construcción colectiva del conocimiento y en la socialización del mismo de una manera más asertiva. De manera particular resulta sorprendente el avance en el estado del arte para la remoción y/o reducción del cromo hexavalente y la aparición de múltiples técnicas y nuevos microorganismos para lograr este cometido.

A efectos de contar con una herramienta alternativa de bioremediación que pudiese remover parte del cromo presente en los biosólidos de la PTAR San Fernando, o mitigar un potencial impacto sobre el medio receptor una vez liberados éstos en el edafón, se han direccionado los esfuerzos de este trabajo, contribuyendo así, al aseguramiento de la calidad de los biosólidos producidos en la PTAR San Fernando.

En el capítulo A se concluye que los microorganismos indígenas presentan mayor capacidad de remoción del cromo que los exógenos y se estandariza el método de la difenilcarbazida para determinar Cr^{6+} ; en el capítulo B, se evalúan 48 microorganismos con potencial bioremediador de cromo y se concluye con la caracterización de 5 especies de hongos y 8 especies de bacterias; el capítulo C explora un tandem (hongo + bacteria) y su efecto rizosférico en plantas de frijol *Phaseolus vulgaris* para contribuir a remover Cr^{6+} y se realiza una prueba de metadiversidad bacteriana con el objeto de explorar microbiota nativa de Andisoles e Inceptisoles que pudieran contribuir en la remoción de cromo hexavalente; el capítulo D determina que el silicato de magnesio es eficiente para fijar o precipitar cromo neutralizándolo en el suelo, finalmente en el capítulo E, se recurre a un prototipo de Rhizotron, para diagnosticar el efecto del cromo en la raíz de lenteja *Lens culinaris* y la sinérgica contribución de un consorcio microbiano con 4 de los microorganismos caracterizados, en combinación con silicato de magnesio, para remediar de cromo el ambiente rizosférico y facilitar el crecimiento de la planta.

Hoy es aceptado universalmente, que los biosólidos pueden ser una solución inteligente para los lodos que producen las PTARs, debido a que convierten los residuos putrescibles e inestables biológicamente, en un producto que puede generar demanda si se gestiona responsablemente y se monitorea su calidad oportunamente, tal como sucede en países altamente industrializados.

De esta forma, los biosólidos pueden reducir costos y generar utilidad, ofreciendo una fuente de abono orgánico como alternativa para algunas actividades agropecuarias o forestales o para la recuperación de zonas degradadas por la minería o en procesos crecientes de desertización. En este contexto, los biosólidos pueden ser una solución confiable y sustentable en el tiempo.

Medellín es una ciudad que crece a una tasa superior a la media nacional, así lo enseñan los indicadores del Departamento Nacional de Planeación. Para el periodo 2018/2019, se tiene contemplado la puesta en marcha de una segunda planta de tratamiento de aguas residuales en el Municipio de Bello-Antioquia, en el área metropolitana de Medellín, que producirá alrededor de 350 toneladas diarias de biosólidos, en comparación con la producción actual de su similar, la planta San Fernando, que genera 90 toneladas diarias como producto del tratamiento de 1100 L s^{-1} de aguas servidas, que deben ser evacuados permanentemente en un proceso en línea de principio a fin.

Esto impone la búsqueda, el compromiso y el hallazgo de soluciones efectivas que contemplen un adecuado monitoreo de la calidad de los biosólidos que será preciso evacuar diariamente. Sin el aval de la autoridad ambiental regional y nacional será difícil lograr este cometido. Avanzar en las investigaciones que permitan conocer cada vez más la calidad de los biosólidos favorecerá la actitud de la comunidad y brindará tranquilidad a todos los actores que deban intervenir para lograr la sostenibilidad del proceso.

1. MARCO TEÓRICO

Los tipos y las fuentes de contaminación al cual un sistema de aguas residuales puede estar expuesto son de diversa índole. Los efluentes domiciliarios, hospitalarios o industriales, pueden ser caracterizados por sus complejos microbiológicos, materiales orgánicos biodegradables, compuestos orgánicos persistentes, sustancias inorgánicas y metales pesados, entre otros, (Amorena, 1995, Nendza, 2002)

La complejidad, el tamaño y la diversidad del parque industrial, así como el número de habitantes de una población determinada, hacen que la matriz de los afluentes que ingresan a una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR), sea cada vez más diversa, compleja y difícil de evaluar, especialmente por las reacciones físico-químicas que puedan magnificar el efecto de algún compuesto en particular, o por el contrario, enmascarar su verdadero potencial (Felipo, 1995 , Viti, Pace, & Giovannetti, 2003).

El impacto ambiental que tiene un efluente sobre el medio receptor depende de los contaminantes que posee, del volumen vertido, la frecuencia de vertimiento y el tiempo de contacto del contaminante en el medio receptor (Stein & Schwedt, 1994). Para estimar dicho impacto, es necesario recurrir a las técnicas de laboratorio, de uso y reconocimiento internacional cuyos protocolos y estándares facilitan la interpretación de los resultados y permiten compararlos con los hallazgos de otros investigadores (Nendza, 2002).

Los monitoreos de la calidad ambiental a través de biotest o de bioensayos, son utilizados con el objeto de evaluar los efectos tóxicos, agudos o crónicos de la contaminación, sobre organismos vivos, para resolver situaciones de incertidumbre respecto de los efectos ambientales de las sustancias de desecho descargadas (Matthew, 1996).

1.1. Biosólidos

Los términos lodos y biosólidos se suelen confundir. Para llegar a biosólidos, los lodos domiciliarios y/o industriales sufren una serie de transformaciones físicas, químicas y biológicas en las cuales las moléculas complejas son degradadas a formas más simples. Algunos patógenos presentes como los helmintos, pueden ser eliminados o disminuidos significativamente a niveles inocuos, cuando se recurre a diversas técnicas como la estabilización alcalina (Overcash et al., 2005, Lee, Tay, Hung & He, 2005 , Torres, Parra, & Puentes, 2008).

A mediados de los años noventa, el termino biosólido fue acuñado para referirse a los lodos estabilizados (Tenenbaum, 1997). En la actualidad el concepto permanece y se hacen recurrentes ajustes en las legislaciones domésticas de cada país (Gantzer et al., 2001, Smith, 2009, Bedoya-Urrego, Acevedo-Ruíz, Peláez-Jaramillo, & Del Pilar Agudelo-López, 2013).

A partir del año 1993, en los Estados Unidos, la producción, transporte y aplicación de biosólidos comienza a ser regulada. Basada en una extensa revisión bibliográfica, la Agencia de Protección Ambiental (EPA), elaboró la denominada norma 40 CFR parte 503 (EPA 503, 1999, EPA, 2002), que identifica riesgos de patógenos y sustancias químicas presentes en los biosólidos. Algunos apartes de dicha norma se describen aquí:

1.1.1 Patógenos

Con base a las densidades de patógenos que posean los biosólidos estos se clasifican en clase A y clase B, según la norma 40 CFR Parte 503. Los biosólidos clase A deben tener (base seca) $< 1 \times 10^3$ UFC g⁻¹ de coliformes fecales, < 1 PFP g⁻¹ de fagos somáticos y < 1 huevo de helmintos viables/ 4g, para que se les confiera aptitud comercial como biofertilizantes, enmienda orgánica o bioabono (EPA 503, 1999). Los tipo B pueden tener $> 2 \times 10^6$ UFC g⁻¹ de coliformes fecales, > 1 PFP g⁻¹ de fagos somáticos y > 1 huevos de helmintos viables/ 4g (EPA 503, 1999, EPA, 2002, Campos & León, 2006). La mayor preocupación respecto a este tipo de biosólidos son los huevos de helmintos, por su resistencia y persistencia, ya que contaminan los alimentos con los que entren en contacto en el corto y en un mediano plazo.

Entre los patógenos más comunes se encuentran las bacterias de los géneros *Salmonella* y *Shigella*, virus como el de la hepatitis A, protozoarios como los de los géneros *Giardia* y *Cryptosporidium* y helmintos (EPA 503,1999).

Los métodos para reducir los patógenos incluyen deshidratación o secado, incremento de la alcalinidad, métodos térmicos, digestiones aeróbicas o anaeróbicas, compostaje, entre otros. El alto costo de evaluación de todos los posibles patógenos de un biosólido ha llevado a utilizar las bacterias coliformes fecales como bioindicadoras (Torres et al., 2008).

1.1.2 Sustancias químicas orgánicas

En los biosólidos los químicos orgánicos no volátiles y de alta persistencia tienden a concentrarse, a éste grupo pertenecen los pesticidas órgano-clorados (Ramos et al., 2006). EPA analizó 200 compuestos orgánicos y encontró que 110 de éstos podrían afectar a los seres vivos y ha puesto énfasis especial en un subgrupo de 50 sustancias entre las que se destacan los bifenilos policlorados (PCBs) como los más peligrosos (EPA 503, 1999). Recientemente las legislaciones de un número cada vez más creciente de países, obligan a remover los nitratos y los fosfatos para evitar problemas de eutrofización. Por el contrario, los compuestos como antibióticos y anabólicos aún no son muy vigilados.

1.1.3 Metales pesados

El riesgo asociado a los metales pesados presentes en algunos biosólidos está dado por su persistencia en el medio ambiente y por tanto, cuando se alcanzan límites estipulados como riesgosos, se deben suspender las aplicaciones de materiales que los contengan (Ratto, Magnabacca & Marban, 2000). Se considera peligroso por ejemplo, comercializar o suministrar biosólidos con niveles de plomo superiores a 840 mg kg⁻¹ (Benítez, 2000).

Entre los años 70's y los 80's la concentración media de plomo en los biosólidos de los Estados Unidos decreció de 969 a 134 mg kg⁻¹, la de níquel de 135.1 a 42.7 mg kg⁻¹ y la de cadmio de 69 a 7.0 mg kg⁻¹. Por el contrario, la concentración de mercurio se incrementó de 2.8 a 5.2 mg kg⁻¹ y la de arsénico de 6.7 a 9.9 mg Kg⁻¹ (Tenenbaum, 1997).

La norma EPA 40 CFR Parte 503 regula diez metales pesados que pueden estar presentes en los biosólidos: arsénico, cadmio, cinc, cobre, cromo, mercurio, molibdeno, níquel, plomo, selenio (EPA, 1999, EPA, 2002).

En los suelos, los metales se distribuyen en varias formas relacionadas con su disponibilidad para las plantas: i) solubles en agua, intercambiables y adsorbidos, ii) ligados a la materia orgánica , iii) asociados a componentes inorgánicos tales como carbonatos, óxidos, sulfuros; iv) residuales, generalmente aluminosilicatos (Schnoor, 1997).

De forma general, los metales de mayor biodisponibilidad para la absorción por las plantas acumuladoras son el Cd, Ni, Zn, As, Se y Cu. De comportamiento moderado son el Co, Mn y Fe, mientras que el Pb, Cr y U prácticamente no son muy biodisponibles (Schnoor, 1997).

Chaney y Giordano (1977) clasificaron los metales así: B, Cd, Mn, Mo, Se y Zn como elementos fáciles de translocar a la parte superior de las plantas Ni, Co y Cu como intermedios, y Cr, Pb y Hg como los translocados en última instancia.

La Ilustración 1 muestra los diez contaminantes más comunes en Estados Unidos de acuerdo con EPA, (2002) entre los que se destacan algunos metales pesados.



Ilustración 1. Tipos de contaminante más frecuentes en vertederos en Estados Unidos. Adaptado de EPA 2002.

1.1.3.1 Cromo

El cromo es un metal bastante duro y poco alterable; su apariencia puede ser granular, polvosa o cristalina (Telles-Mosquera, J., Carvajal, R., Gaitan, 2004). El cromo se encuentra en la naturaleza como cromito ferroso (FeOCr_2O_3), aunque con fines industriales sólo se pueden utilizar los minerales concentrados con contenidos superiores al 40% de óxido de cromo Cr_2O_3 . La aplicación industrial más importante del cromo es el cromado de una gran variedad de metales, como piezas de automóvil y equipos eléctricos (ATSDR, 1998). También se utiliza en aleaciones con hierro y níquel para formar acero inoxidable (Labunska, Brigden, Johnston, Santillo, & Ashton, 2000).

El cromo puede tener distintos estados de oxidación que corresponden a sus respectivas valencias. Los más importantes son el Cr^{2+} (cromosos), Cr^{3+} (crómicos) y Cr^{6+} (cromatos) (Kotaś & Stasicka, 2000). En las aplicaciones industriales se utilizan fundamentalmente los compuestos de Cr^{6+} debido a sus propiedades ácidas y oxidantes y a su capacidad para formar sales muy coloreadas e insolubles (ATSDR, 1998). Los compuestos hexavalentes de cromo (Cr^{6+}) más importantes son el dicromato sódico, el dicromato potásico y el trióxido de cromo. Además, los sulfatos crómicos básicos, se utilizan ampliamente en los procesos de curtido de pieles (Labunska et al., 2000).

1.1.3.1.1 Cromo Trivalente

El cromo trivalente (Cr^{3+}) es poco soluble y muy estable y se lo considera un elemento traza esencial para la vida; necesario para mantener los niveles correctos del metabolismo de la glucosa,

lípidos y proteínas. En humanos, los niveles oscilan entre 50 y 200 $\mu\text{g día}^{-1}$ (Brose & James, 2008, Kotaś & Stasicka, 2000, Telles-Mosquera, J., Carvajal, R., Gaitan, 2004). Además, el Cr^{3+} está involucrado en reacciones enzimáticas tromboplásticas y en la síntesis de la betaglucoronidasa y ha sido señalado como un cofactor en la iniciación de la acción periférica de la insulina (Telles-Mosquera, J., Carvajal, R., Gaitan, 2004). Sin embargo, en exceso el Cr^{3+} puede llegar a causar toxicidad, aunque al parecer es 100 veces menos tóxico que la forma hexavalente (Cr^{6+}). La dosis letal media (LD_{50}) en roedores ha sido estimada entre 1900 y 3000 mg kg^{-1} (De Flora et al., 2008). EPA, (2003) afirma que no existen evidencias de que Cr^{3+} actúe como agente cancerígeno y que esta forma de cromo ha sido clasificada dentro del grupo D, es decir, no cancerígeno para humanos.

1.1.3.1.2 Cromo Hexavalente

El cromo hexavalente (Cr^{6+}) es más soluble y menos estable que el trivalente (Cr^{3+}) y por el contrario se constituye en un contaminante ambiental tóxico, cancerígeno y mutagénico (Gove, Cooke, Nicholson, & Beck, 2001, Stein & Schwedt, 1994). Estudios realizados en trabajadores expuestos a compuestos de Cr^{6+} en procesos de soldadura de aceros, producción de pigmentos y otras ocupaciones industriales, revelaron el poder mutagénico del Cr^{6+} pudiendo producir lesiones en la piel, enfermedades pulmonares y varias formas de cáncer (Azmat & Khanum, 2005, Kotaś & Stasicka, 2000). La LD_{50} en ratas fluctúa entre 50 y 100 mg Kg^{-1} (De Flora et al., 2008). EPA ha clasificado Cr^{6+} dentro del grupo A, es decir, sustancias que pueden inducir cáncer en humanos por medio de inhalación.

Se ha propuesto que Cr^{6+} actúa dentro de las células generando “intermediarios” reducidos de cromo que en presencia de H_2O_2 actúan como catalizadores de una reacción tipo Fenton, generando especies reactivas de oxígeno (ROS) con el consecuente daño oxidativo, produciendo peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas y ácidos nucleicos (Gutiérrez Corona et al., 2010).

Lewis, & Levering (2004) señalan que esta forma de cromo (Cr^{6+}) puede alterar seriamente el equilibrio biológico causando efectos tóxicos tanto en plantas como en animales, ya que es rápidamente absorbido por las membranas biológicas y que industrias como curtiembres, galvanoplastias, metalurgias, producción de pigmentos, fertilizantes, inmunización de maderas e incineración de productos industriales como aceites y cueros, liberan este contaminante al suelo, cuerpos de aguas o a la atmósfera (Kotaś & Stasicka, 2000) En plantas, un estrés oxidativo inducido por Cr^{6+} causa severos daños, degradando los pigmentos fotosintéticos y deteniendo el crecimiento (Panda & Choudhury, 2005).

En España, 54% de las personas que consultaron por dermatosis al departamento de Dermatología Laboral del Instituto de Medicina, Higiene y Seguridad del Trabajo en Madrid, eran trabajadores expuestos a compuestos de cromo, especialmente dicromato de potasio (Telles-Mosquera, J., Carvajal, R., Gaitan, 2004). EPA, (2002) recomienda que en análisis practicados a humanos, de orina, sangre o cabello, se estime el contenido total del cromo, ya que en los resultados resulta difícil diferenciar y precisar la especie.

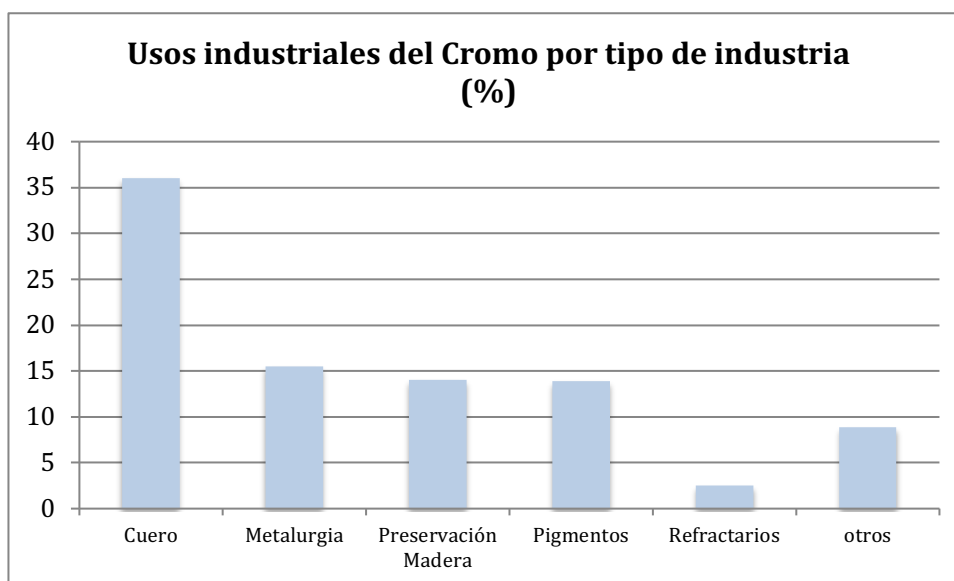


Ilustración 2. Demanda del consumo mundial de cromo por tipo de industria (%) (Adaptado de EPA 1997).

La presencia y concentración de las formas de cromo en una PTAR dependerá principalmente de los componentes de cromo aplicados en los procesos y de la tecnología empleada en el parque industrial, del pH, de la fracción orgánica e inorgánica procedente en los efluentes industriales y domiciliarios, de la presencia de elementos ligantes o cohesionantes y de las reacciones redox. Así, el Cr^{6+} predominará en las aguas residuales de industrias metalúrgicas, acabados metálicos, recubrimiento duro, materiales refractarios, producción o aplicación de pigmentos y cromados anticorrosivos. El Cr^{3+} estará presente en la industria del cuero, la impresión de textiles, el revestimiento y decoración de metales, la inmunización de maderas (Kotaś & Stasicka, 2000).

1.2. Oxido-reducción de Cromo Trivalente y Hexavalente

La especiación se define como la separación y cuantificación de los diferentes estados de oxidación o formas químicas de un elemento en particular. Esta clase de análisis es esencial para predecir y modelar el destino, el riesgo y los efectos de un elemento químico en el ambiente (Montauban-González, 2013).

Los análisis de especiación pueden describirse como procesos que arrojan información cualitativa y cuantitativa de la forma química de algún elemento en varias muestras y relacionarlas con su trazabilidad (Kumral, 2007). La especiación involucra los pasos de separación y determinación y es realizada en diferentes estados de oxidación, iones simples o coordinados, formas neutrales o aniónicas, protonadas o desprotonadas y monómeros o polímeros (Kotaś & Stasicka, 2000, Kumral, 2007).

Cr^{3+} y Cr^{6+} son los dos estados más comunes de oxidación del cromo en el medio ambiente y tales formas muestran diferente reactividad química, fisicoquímica y bioquímica; por ello, se requiere que su evaluación sea realizada con técnicas de especiación de suficiente selectividad y alta sensibilidad (Kumral, 2007).

En el suelo el Cr^{3+} es relativamente inmóvil debido a su gran capacidad de adsorción, pero el Cr^{6+} es bastante inestable (Brose & James, 2008, Kumral, 2007). Las reacciones redox afectan su biodisponibilidad y su toxicidad (Kotaś & Stasicka, 2000). La oxidación puede ocurrir en condiciones aeróbicas, en suelos húmedos y levemente ácidos, en presencia de óxidos de hierro y manganeso (Brose & James, 2008, Kotaś & Stasicka, 2000). La reducción, puede ocurrir en

condiciones anaeróbicas, en presencia de hierro y sulfuros y se acelera cuando reacciona con la materia orgánica del suelo (Lewis & Levering, 2004).

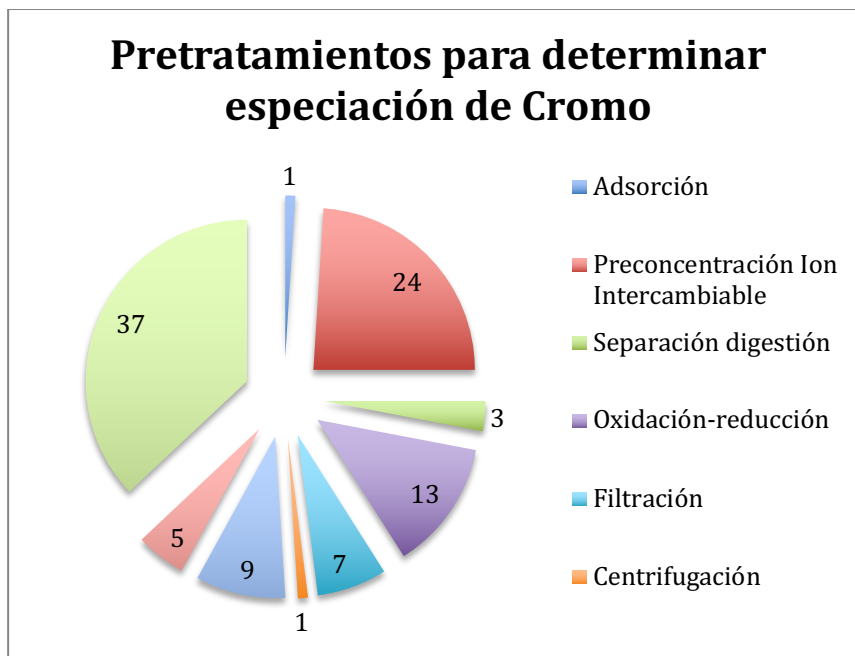


Ilustración 3. Métodos de pretratamientos usados para la especiación de cromo (Adaptado de Kumral, 1997).

Según EPA, (2002) cromo hexavalente se mantiene soluble en los suelos en corto tiempo, pero eventualmente se reduce a trivalente y entonces cambia a formas de baja solubilidad. Hexavalente es tóxico en plantas, pero los lodos contienen muy poco de ésta forma, porque el cromo hexavalente se reduce a trivalente durante el proceso de digestión de los lodos y esa sería la razón de los bajos niveles encontrados en las 11407 plantas evaluadas por EPA en 1988 en USA. (EPA, 2009 comunicación personal con el funcionario Héctor Danois).

Avudainayagam et al., (2003), basados en antecedentes de niveles alarmantes de Cr^{6+} en cuerpos de agua en China, India y Australia, evaluaron la especiación relativa al cromo y la estabilidad termodinámica del Cr^{3+} en suelos tratados con aguas residuales provenientes de la industria del cuero. Estos autores observaron que algunos minerales que contienen óxidos de manganeso pueden favorecer la transformación de Cr^{3+} a Cr^{6+} haciendo este último biodisponible a niveles altos de pH superiores a 7.5.

Algunos investigadores argumentan que el Cr^{3+} podría oxidarse a Cr^{6+} convirtiéndose en una amenaza para la población (Apte, Verma, Tare, & Bose, 2005, Brose & James, 2008, Labunska et al., 2000, Kotaś & Stasicka, 2000, Kumral, 2007, Sharma & Adholeya, 2012) mientras que Cr^{3+} y Cr^{6+} pueden inter-convertirse y esto es de gran importancia ambiental (Viti et al., 2003, Sharma & Adholeya, 2012, Apte et al., 2005). Estos autores afirman que algunos organismos vivos, compuestos ferrosos, azufrados y la materia orgánica pueden contribuir a la reducción. Sin embargo, sostienen que la oxidación de Cr^{3+} a Cr^{6+} también es posible y está directamente relacionada con el contenido de óxidos de Mn del suelo. Kotaś & Stasicka, 2000, Apte et al., 2005) sostienen que en el equilibrio entre Cr^{3+} y Cr^{6+} en soluciones aireadas, el rol del pH y el potencial redox debe ser enfatizado. Apte et al., (2005) en un estudio llevado a cabo en India, determinaron los rangos de pH y la presión parcial de oxígeno que se requieren para pasar de Cr^{3+}

a Cr^{6+} . Los rangos de pH estarían entre 3 y 10 y la presión de oxígeno (PO_2) en 10^{-6} atm o superiores.

Brose & James, (2008) estudiaron la oxidoreducción en 18 toposecuencias de suelos de Maryland, observando reducción de Cr^{6+} a Cr^{3+} en todas las muestras y oxidación de Cr^{3+} a Cr^{6+} en 12 de las 18 muestras evaluadas y concluyeron que los mismos mecanismos que favorecen la reducción, pueden favorecer la oxidación.

La oxidación de Cr^3 a Cr^{6+} puede darse por diferentes agentes en el suelo, especialmente por el manganeso, mientras que las reacciones de reducción de Cr^{6+} a Cr^3 principalmente por los compuestos de carbono presentes en la materia orgánica. Estas reacciones son termodinámicamente espontáneas y tanto la oxidación como la reducción pueden llevarse a cabo en un mismo suelo (Bartlett & James, 1979).

Violante, Cozzolino, Perelomov, Caporale, & Pigna, (2010) afirman que no sólo las condiciones citadas influyen las reacciones redox, sino también la concentración de algunos ácidos húmicos y fúlvicos, la presencia de exudados radiculares y algunos metabolitos microbiales. Estos autores señalan además, que en la biodisponibilidad de metales y metaloides participan procesos tanto bióticos como abióticos y que los mecanismos de precipitación-disolución, adsorción-desorción, complejación-disociación, pueden jugar un rol importante en la interconversión iónica.

Las reacciones redox llevadas a cabo por microorganismos pueden ser asimilatorias, cuando el metal está involucrado en las reacciones metabólicas del organismo que actúa como aceptor de electrones. En las desasimilatorias aún se desconoce el rol del metal sobre el metabolismo microbial que propicia la reacción redox (Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez, 2016). Algunos microorganismos pueden detoxificar metales reduciendo enzimáticamente un metal en procesos metabólicos que no se relacionan con la asimilación de éste, tal es el caso de bacterias que acoplan algunos ácidos orgánicos, alcoholes, o compuestos aromáticos en la reducción de Fe (III) o Mn (IV) (Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez, 2016).

Referente a los ligantes o cohesionantes se afirma, que los ácidos húmicos acomplejan el Cr^{3+} cuando el pH está entre 2.7 y 4.5 tornándolo estable y no reactivo mediante la formación de anillos quelatados, en tanto que los ácidos fúlvicos, el ácido cítrico y el ácido dietileno-triaminopentacético (DTPA), son considerados ligantes móviles que acomplejan el Cr^{3+} débilmente y podrían permitir la oxidación a Cr^{6+} (Kotaś & Stasicka, 2000).

Diversos autores se refieren a la práctica de depositar residuos que contienen Cr^{3+} provenientes de curtiembres, en rellenos sanitarios junto con otros desechos industriales ácidos o desechos domiciliarios, que favorecen un medio ácido al descomponerse y permiten transformar el Cr^{3+} en Cr^{6+} (Avudainayagam et al., 2003, Labunska et al., 2000, Kotaś & Stasicka, 2000). No obstante, otros como Molina (2004), sostienen que las condiciones ambientales que se requieren para hacer posible ésta transformación son bastante improbables de alcanzar en condiciones naturales tanto en suelos como en cuerpos de agua y atmósfera y que, por el contrario, sería el Cr^{6+} el que podría cambiar a Cr^{3+} en virtud de su alta inestabilidad. Afirma este autor, que la forma trivalente no migra de manera significativa en los sistemas naturales sino que se precipita rápidamente y se adsorbe a las partículas en suspensión y sedimentos. Shanker, Cervantes, Loza-Tavera, & Avudainayagam, (2005) plantean que las altas concentraciones del ión en estado hexavalente pueden sobrepasar la capacidad de reducción del medio, lo que impediría su adecuada inmovilización. Estos hallazgos plantean la necesidad de vigilar y gestionar las actividades antrópicas que liberan cromo al ambiente, al no existir garantía alguna de que éste permanezca en estado trivalente (Sharma & Adholeya, 2012, Avudainayagam et al., 2003).

El protocolo PCOS (Potencial Chromium Oxidation Score) desarrollado por James y colaboradores (1997) está basado en cuatro parámetros interactuantes, la solubilidad y forma de

Cr^{+3} , la reactividad del Mn en el suelo, el potencial de reducción de Cr^{6+} y el pH como modificador de los parámetros anteriores. La cuantificación y sumatoria de ellos arroja el valor PCOS. Cuando dicho valor está entre 10 y 40 existiría una elevada posibilidad de oxidación y persistencia de Cr^{6+} en el suelo favoreciendo la bioacumulación (James et al., 1997).

1.3. Estrategias biotecnológicas para la Gestión de Residuos

1.3.1 Bioremediación

Una de las formas más costo-efectiva, rápida, segura, eficiente y responsable ambientalmente, para gestionar el manejo de residuos potencialmente activos, es la bioremediación, una rama de la biotecnología (Seoáñez Calvo & Gutiérrez de Ojesto, 1999, Viti et al., 2003). En la actualidad existen métodos biotecnológicos para mitigar, reducir o eliminar los riesgos en la disposición final de cualquier residuo líquido o sólido (Gutiérrez Corona et al., 2010). La biotecnología emplea, entre otros, organismos vivos que incluyen bacterias, hongos, levaduras, algas y virus, para llevar a cabo procesos específicos con algún interés industrial o degradar agentes tóxicos y desechos potencialmente activos, para restaurar suelos, subsuelos, cuerpos de agua y acuíferos contaminados (Cala, Cases, & Walter, 2005).

La bioremediación puede ser definida como el uso de organismos vivos, componentes celulares o enzimas libres, con el fin de realizar una transformación parcial, mineralización, humificación de los residuos o una alteración de los agentes contaminantes y del estado redox de los metales. Muchos organismos sensibles a su ambiente cambian aspectos de su forma, mueren, o por el contrario, prosperan cuando su medio se contamina (Silva, Torrejón, Bay-Schmith, & Larrain, 2003). Tales organismos suelen emplearse como bioindicadores, biomonitores o biosensores en pruebas conocidas como biotest.

La bioremediación, se apoya en el empleo de organismos vivos para llevar a cabo procesos de descontaminación y detoxificación. La transformación puede incluir o no, rutas enzimáticas y ocurrir a nivel intra o extracelular. Las enzimas cromo-reductasa, nitrato-reductasa, flavin-reductasa, ferri-reductasa y algunas flavoproteínas, podrían jugar un papel importante en la detoxificación (Gutiérrez Corona et al., 2010). Estos métodos suelen ser seguros, económicos y más rápidos que algunos tratamientos fisicoquímicos, especialmente si se utilizan cepas de organismos indígenas reconocidas por su actividad remediadora y específica. Los costos de transporte y fletes son inferiores, comparados con los métodos convencionales usados en la disposición final de contaminantes (Muñoz, 2004).

El grupo más numeroso de microorganismos en el suelo lo constituyen las actinobacterias que toleran condiciones adversas. Son comunes los géneros *Nocardia*, *Arthrobacter* y *Streptomyces* (Gutiérrez Corona et al., 2010). La bacteria *Geobacter sulfurreducens*, abundante en ambientes anaeróbicos, provoca la precipitación de un gran número de metales como el uranio, el tecnecio y el cromo, permitiendo la descontaminación de aguas que los contienen. De igual manera, el citocromo tres (c3) de *Desulfovibrio vulgaris*, actuaría como cromoreductasa para reducir Cr^{+6} a Cr^{+3} (Lovley & Phillips, 1995).

Los hongos del suelo también son extremadamente importantes en la descomposición, degradando y utilizando macromoléculas complejas o remediando ambientes contaminados. Ellos varían con el tipo de suelo y las propiedades fisicoquímicas de éste. Son comunes, especies de los géneros, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Mucor* en procesos exitosos de remediación. Algunos son de vida libre y otros, como las micorrizas, están en forma simbiótica asociados con las raíces de plantas.

Los ensayos realizados con micorrizas permiten pensar que este tipo de hongos pueden jugar un papel relevante en la bioremediación y que la alta sensibilidad específica permitiría elegir algunas especies como bioindicadores. Investigadores de la Universidad de Torino, trabajando con semillas de abeto y álamo de Noruega en suelos contaminados con petróleo, encontraron que algunas especies de ecto y endomicorrizas, presentaban diferentes comportamientos que fluctuaban desde la estimulación hasta la inhibición total del crecimiento, en virtud de la dosis de crudo y de la especie evaluada (Nicolotti & Egli, 1998).

Tabla 1. Principales géneros con potencial bioremediador de metales pesados (Cd, Cr y Hg) evaluados por diversos autores.

Microorganismos	Remoción
<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Cunninghamella echinulata</i> , <i>Rhizopus estolonifer</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>T. reesei</i> , <i>Glomus</i> sp., <i>Acaulospora</i> sp., <i>Gigaspora</i> sp.	Cd
<i>Staphylococcus sylosus</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>Deinococcus radiodurans</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Thermos thermophilus</i> , <i>Acidiphilium angustum</i> , <i>Flavobacterium acuatile</i> , <i>F. hibernum</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Rhodobium marinum</i> , <i>Rhodobacter sphaeroides</i> .	Cd
<i>Pseudocrobactrum saccharolyticum</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. ambigua</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Micrococcus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Achromobacter</i> sp., <i>Microbacterium</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium metallidurans</i> , <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Vogesella indigofera</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Acinetobacter</i> sp., <i>E. coli</i> , <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> .	Cr
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Listeria</i> sp., <i>E. coli</i> , <i>A. eutrophus</i> , <i>P. putida</i> , <i>Aeromonas</i> sp., <i>S. aureus</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp..	Cr, Cd
<i>Bacillus</i> spp.	Cd, Cr, Hg
<i>Shewanella oneidensis</i> .	Hg

Adaptado de (Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez, 2016)

El uso de algas en la remoción de iones metálicos también ha sido estudiado por varios autores. Con la aparición de las técnicas moleculares, el cultivo de micro y macroalgas ha abierto un horizonte inexplorado en la bioremediación (Zeraatkar, Ahmadzadeh, Talebi, Moheimani, & McHenry, 2016). Del mismo modo, el uso de enzimas o bio-catálisis ha sido de gran utilidad y en los últimos años ha ganado prestigio y reconocimiento entre los investigadores. Su ventaja reside en la alta selectividad, precisión y eficiencia frente a los procesos químicos que normalmente demandan condiciones de temperatura y presión elevadas (Mora Collazos, 2016).

La fitoremediación, a través de plantas terrestres o acuáticas puede contribuir en la detoxificación y se constituye en un capítulo importante de la bioremediación. Troung, (2005) del Departamento de Recursos Naturales de Queensland, ha desarrollado sistemas de fitoremediación con *Vetiver*, *Vetiveria zizanioides*, en algunas localidades como Yolo al Norte de California, donde se presentan graves problemas de polución por metales pesados. Zhang, Chen, Luo, & Li, (2014), reportaron la habilidad de *V. zizanioides* para remover cromo en ensayos de fitoremediación conjuntamente con lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*). La fitoremediación ha encontrado en especies como *Halimione portulacoides* una alternativa para reducir cromo hexavalente a trivalente y/o capturar iones de cromo a nivel radicular (Duarte, Silva, & Caçador, 2012). *Plagioclasma appendiculatum* ha resultado altamente sensible a ambientes contaminados con mercurio y cobre pero resistente a la presencia de plomo, cadmio y cromo (Ghate & Chaphekar, 2000).

Los suelos ultramáficos derivados de Serpentina poseen de manera natural una amplia gama de

metales pesados, entre ellos cromo. En ecosistemas evolucionados derivados de éste tipo de suelos en diferentes pisos térmicos, se han encontrado cerca de 20 géneros endémicos de plantas con gran potencial fitoremediador. Se cree que la familia Brassicaceae posee el mayor número de plantas hiperacumuladoras.

1.3.2. Biotest

Los biotest en una muestra de suelo, agua, efluente o compuesto puro, pretenden estimar diferentes niveles de concentración que brindan una interpretación ambiental en función del efecto biológico de dicha concentración. Algunos microorganismos pueden ser utilizados como indicadores en un ambiente específico que ha sido contaminado. Estos deben pertenecer a especies que representen fielmente las características del medio, deben ser confiables y fácilmente identificables (Silva et al., 2003). Los microorganismos usados como indicadores de contaminación de agua o suelo deben estar ausentes del medio específico (agua ó suelo), a menos que éste haya sido contaminado y generalmente, no son miembros de la flora indígena del suelo o del sistema acuático (Silva et al., 2003). Dentro de los organismos comúnmente utilizados en los bioensayos de toxicidad se encuentran los cladóceros, o pulgas de agua (generalmente *Daphnia magna*). Éstos micro-crustáceos que constituyen la mitad de la clase Branchiopoda se reproducen partenogenéticamente (sin la concurrencia de los espermatozoides) cada tres o cuatro días, conformando una población constituida solamente por hembras (Tortorelli, 1995).

A partir de 1984, EPA ha recomendado incluir los biotests en la evaluación de toxicidad aguda en muestras de agua. Los Daphnidos, altamente sensibles, responden a un gran número de agentes tóxicos de naturaleza diversa y representan una comunidad importante en el ecosistema acuático siendo responsables por la transferencia de energía de un nivel a otro dentro de la cadena trófica (EPA, 1999).

El pólipo pluricelular de agua dulce *Hydra attenuata* es empleado por su rápida reproducción, su estructura primaria (ectodermo, mesodermo y endodermo) que favorece el intercambio intra e intercelular, aumentando su potencial para la detección de tóxicos, así como por su habilidad para presentar cambios morfológicos, fácilmente reconocibles bajo condiciones progresivas de intoxicación (Trottier, Blaise, Kusui, & Johnson, 1997). *H. attenuata* permite determinar subletalidad y letalidad potencial en sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y aguas de pozo de sedimentos (Trottier et al., 1997).

Selenastrum capricornutum (*Pseudokirchneriella subcapitata*) es una alga verde clorofita, unicelular, con forma de media luna, muy utilizada de manera individual o como parte de una batería de ensayos para estimar la potencial fitotoxicidad en aguas dulces superficiales o subterráneas, aguas servidas y otro tipo de muestras líquidas como lixiviados, agua intersticial de sedimentos o cualquier compuesto puro soluble en agua (Hindák & Hindáková, 2008).

Las bacterias del género *Photobacterium* se distinguen por la producción de bioluminiscencia debida a la presencia de una enzima denominada luciferasa que en presencia de oxígeno y ATP da lugar a luz (Bulich, 1988). Para que se produzca la síntesis de luciferasa es necesario que se alcance un número de bacterias suficientemente alto, las cuales miden la concentración de una señal (*quorum sensing signal*) que cada una emite y que a su vez es función de la cantidad total de ellas. Su alta sensibilidad a los contaminantes disminuye la población bacteriana y por consiguiente la producción de bioluminiscencia (Bulich, 1979, Bulich, 1988 , Ivask, 2002). Cepas liofilizadas de *P. phosphoreum* han sido utilizadas por Bulich, (1979) dada su respuesta a una gran variedad de tóxicos.

Celis et al., (2006) trabajando con biosólidos derivados de la industria del salmónicultura en Chile, encontraron la mejor respuesta en un bioensayo con el crecimiento *Lactuca sativa*. Por el contrario, el biosólido urbano fue el que presentó menor índice de germinación, menor crecimiento radicular y pobre desarrollo del hipocótilo, especialmente cuando la dosis de lodo aplicado al suelo alcanzó los 150 Ton ha⁻¹. Coincidentemente a este nivel de aplicación se presentaron las mayores concentraciones de NH₄⁺, Cu²⁺ y Zn²⁺, conocidos por ser fitotóxicos para las semillas.

Hoy, son utilizados también macroorganismos invertebrados como la lombriz de tierra, *Eisenia foetida*, y el gusano *Enchytraeus albidus* (Schmidt y Schaffer, 2012). Ávila et al., (2007) en suelos de minería de la cuenca del río Aconcagua, Chile, contaminados con cobre y arsénico encontraron que *E. foetida* mostró una baja mortalidad, indicando la ausencia de toxicidad aguda. Además, observaron disminución en la producción de capullos y poco desarrollo de estados juveniles, que indicaría la existencia de toxicidad crónica.

Folsomia candida, un colémbolo, es un importante organismo del suelo que ha sido propuesto para elaborar biotest por su particular habilidad de moverse a través de las capas del suelo (Schmidt y Schaffer, 2012). El nemátodo *Caenorhabditis elegans* ha sido incluido recientemente en una batería de biotest por el profesor Traunsपुरger del Departamento de Ecología Animal de la Universidad Bielefeld, Alemania (Tejeda-Benitez, Flegal, Odigie, & Olivero-Verbel, 2016).

Desde la introducción de *Artemia salina*, a principios del siglo pasado, para la evaluación de la toxicidad aguda, numerosas especies han sido propuestas para este fin, *A. mónica*, *A. urmiana*, *A. franciscana*, *A. persimilis*, *A. sínica* y *A. tibetiana*, en virtud de la tolerancia de estos crustáceos a los ambientes salobres, su gran capacidad de adaptación en todos los continentes y su reproducción partenogénica (originando poblaciones di, tri, tetra y pentaploides). Con excepción de América, donde se reproduce sexualmente con descendencia diploide, *Artemia* spp. es utilizada aún para la evaluación de toxicidad por cromo (Huang, Wang, & Liu, 2015, Trottier et al., 1997).

Así mismo, en los últimos años múltiples organismos vertebrados o invertebrados, uni o pluricelulares han sido evaluados para tal fin como *Streptocephalus proboscideus*, *Brachionus calyciflorus*, *B. plicatilis* (Calleja, y Persoone, 1992), *Tetrahymena piriformis*, *Asellus aquaticus*, *Tubifex* spp., (Balls et al., 1992). *Ceriodaphnia dubia* (Hlywka et al., 1997), *Chlorella kessleri*, *Chlamydomonas reinhardtii* (Fouradzieva et al., 1995), *Pseudokirchneriella subcapitata* (Aruoja et al., 2008), *Saccharomyces cerevisiae* (Kasemets, Ivask, Dubourguier, & Kahru, 2009), *Alcaligenes eutrophus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Burkholderia* sp., *Bacillus sphaericus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Caenorhabditis elegans*, *Tetraselmis chuii*, *Clorella vulgaris*, *Phormidium* sp., *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhizopus arrhizus* (Turdean, 2011), *Photobacterium* sp., *Alteromonas* sp. (Charrier et al., 2006) y *Pseudomonas putida* (EPA, 2003).

2. ANTECEDENTES Y RESULTADOS

Este proyecto de investigación se originó en el año 2002 y ha sido auspiciado por Empresas Públicas de Medellín (EPM). Durante su evolución se han llevado a cabo una serie de experimentos que han dado lugar a cuatro tesis de grado en programas de pregrado y posgrado de la Universidad Nacional de Colombia, sede de Medellín, así: una tesis de pregrado en Ingeniería Agronómica para titular a Juliana Morales, dos tesis de maestría en biotecnología para la titulación de Luisa Quiróz e Isabel Ortega, una tesis de maestría en medio ambiente y desarrollo para el título de Juan Vélez y la presente tesis doctoral a cargo del mismo estudiante.

La tesis de maestría de Juan Vélez, consistió en evaluar los metales pesados presentes en los biosólidos de la PTAR San Fernando de EPM y la ruta que toman dichos metales en el edafón una vez liberados al medio ambiente al aplicar biosólidos como enmienda asimilable a orgánica. Este trabajo contó con la asesoría del profesor Ramiro Ramírez.

Con Juliana Morales se corrieron experimentos, para el ajuste del medio mínimo de Lee y para la calibración del método de la difenilcarbazida en la determinación de cromo hexavalente, acompañados por el Profesor Walter Osorio.

Isabel Ortega adelantó ensayos y experimentos relacionados con el potencial de oxidoreducción del cromo y la capacidad de adsorción de las especies trivalente y hexavalente en dos suelos diferentes, bajo la asesoría del profesor Orlando Ruiz.

La estudiante Luisa Quiróz, trabajó en la exploración de algunos microorganismos con potencial biotecnológico para reducir cromo hexavalente a trivalente bajo la dirección de un equipo asesor compuesto por los profesores Olga Montoya, Orlando Ruiz, Sergio Ordúz y el doctorando Juan Vélez. Los aislados microbiológicos llevados a cabo en esta fase, así como su purificación y escalamiento, fueron un input *sine qua non*, para avanzar en éste estudio doctoral, con el acompañamiento del mismo comité asesor.

La evaluación de los metales pesados en el estudio mencionado llevado a cabo por Juan Vélez, concluyó que dichos metales presentes en los biosólidos de la PTAR San Fernando, para los años 2002-2006, no superaban los niveles críticos regidos por EPA; que cinco de los diez metales reglamentados estaban por debajo de los límites de detección de los equipos y que sólo el cromo, podría llegar a ser potencialmente peligroso para la ciudad de Medellín, en virtud principalmente de la industria marroquinera y las empresas curtiembres que la surten y que harían parte del polígono industrial de la ciudad para ese cuatrienio. Esa fue la razón principal para enfocar en el cromo y algunas alternativas de bioremediación consideradas en esta tesis doctoral.

2.1. Capítulo A

Comparar la capacidad para remover o reducir Cr⁶⁺ a Cr³⁺ de microorganismos nativos y exógenos, cultivados en medio mínimo de Lee (MML) modificado, adicionado con dosis crecientes de cromo.

2.1.1. RESUMEN

La reducción de la especie Cr⁶⁺ a Cr³⁺ es aceptada como un indicador de disminución de la contaminación ocasionada por éste metal, ya que la forma hexavalente se asocia con daños irreversibles en la salud animal, en tanto que la forma trivalente, se considera vital y es necesaria en pequeñas dosis para el correcto funcionamiento de algunos procesos metabólicos.

Con el objetivo, validar y estandarizar bioensayos para detectar presencia de cromo y remoción del metal; que fuesen simples, de corta duración, bajo costo, fácil obtención, disponibilidad local, mínima dependencia de equipos sofisticados y factibles de replicar, se llevó a cabo el primero de cinco ensayos, tendiente a calibrar métodos para aislar, cultivar y evaluar microorganismos indígenas colectados de la industria curtiembre, que pudieran ser promisorios para ensayos ulteriores, seleccionados por su capacidad cromotolerante.

Varios biotipos bacterianos fueron hallados prosperando en los colectores de aguas residuales cromadas de la empresa Curtiembres Itagüí, Antioquia, Colombia. Éste primer ensayo reporta dos de tales biotipos los cuales fueron codificados como ETCR 10 y CC13 y posteriormente comparados con tres especies exógenas, reconocidas por su capacidad para reducir cromo hexavalente a trivalente: *Bacillus subtilis*, *Rhizobium* sp. y *Paecilomyces lilacinus*. Los cinco microorganismos fueron incubados en Medio Mínimo de Lee (MML), enriquecido con dosis crecientes de cromo y su biomasa sometida a una reacción con difenilcarbazida para observar coloración violeta a 540 nanómetros (nm) como indicador de presencia de Cr⁶⁺. Las bacterias indígenas presentaron mejor comportamiento y CC13 removi6 hasta el 100% de cromo a una concentración de 400 ppm de Cr⁶⁺. Los microorganismos ex6genos presentaron remociones variables pero consistentes.

2.1.2. ESTADO DEL ARTE

Los biotest utilizan microorganismos para identificar, cuantificar y generar criterios en el control de la descarga de contaminantes o para su remediación y pueden estar constituidos por uno o varios microorganismos, o un tejido vivo, para evaluar los efectos de cualquier sustancia potencialmente activa, estableciendo relaciones que estiman dosis-respuesta (Nepomuscene, Daniel, & Krastanov, 2007).

Los biotest se apoyan en el uso de bioindicadores microbiol6gicos que deben reflejar no solamente la presencia o ausencia de la contaminación de un tipo espec6fico, sino tambi6n los niveles de ésta y sus fluctuaciones peri6dicas (Coleman & Qureshi, 1985).

La estandarización de biomonitores tiene que ver con las especies bioindicadoras que se emplear6n en los ensayos y deben ser sensibles a los t6xicos, ya que al establecer las concentraciones seguras para ellos, se espera proteger a todo el ecosistema (Tortorelli, 1995). Dichos organismos son usados como sensores requiri6ndose que sean fuertemente esten6gicos para que no sobrevivan en condiciones diferentes a las de la masa poblacional a la que caracterizan. Aquellos resistentes o tolerantes podr6n ser usados como remediadores. La mayoría de estudios estiman caracter6sticas estructurales a diferentes niveles de organizaci6n, como cambios en la estructura celular o en la diversidad de especies, reproducci6n, respiraci6n, tasas metab6licas,

entre otras. Por ejemplo, el ensayo de toxicidad aguda utilizando *Spirillum volutans* se basa en el principio de que esas bacterias, extremadamente móviles, pierden su coordinación flagelar y movilidad típica frente a sustancias tóxicas (Coleman & Qureshi, 1985).

Los biotest más comunes incluyen inhibición de la nitrificación, respirometría, inhibición enzimática y luminiscencia del trifosfato de adenosina (ATP) (Dalzell et al., 2002). La enzima ureasa, por ejemplo, ha sido propuesta como biosensor, ya que su actividad se ve inhibida en presencia de metales pesados, especialmente cromo (Nepomuscene et al., 2007).

Gruiz, et al., (1996) sometieron en un biotest a *Azotobacter agile* y *Pseudomonas fluorescens* mediante la técnica de inhibición de la enzima dehidrogenasa para evaluar metales pesados con resultados prometedores.

Recientemente una cepa del hongo *Paecilomyces* sp. ha sido evaluada en la Universidad de San Luis de Potosí-México en la remoción de Cr^{6+} y se encontró que 1 g de biomasa fúngica removió entre 100 y 1000 mg del metal por cada 100 mL a una y tres horas de incubación y además eliminó totalmente 297 mg g^{-1} de Cr^{6+} en un suelo contaminado con éste metal (Cárdenas et al., 2010, Cárdenas-González, Martínez-Juárez, & Acosta-Rodríguez, 2011).

Gloeophyllum sepiarium fue evaluado para remediar cromo en suelos contaminados logrando remover después de seis meses hasta el 94 % de Cr^{6+} . Así mismo *G. sepiarium*, después de su inoculación incrementó el contenido de materia orgánica, carbón, nitrógeno y fósforo presente en los suelos contaminados (Achal, Kumari, & Pan, 2011). Algunos autores sostienen que la cantidad de metal removido por la biomasa de diferentes microorganismos como *Mucor hiemalis* y *Rhizopus nigricans* aumenta en proporción directa con el incremento de la concentración del ión metálico en solución (Tewari, Vasudevan, & Guha, 2005).

Los mecanismos de interacción del cromo con células fúngicas o microbiales incluyen biotransformación directa e indirecta, inmovilización, biosorción, incorporación, cometabolismo y bioacumulación. Tales mecanismos son aún inciertos y se desconocen aspectos fundamentales de los procesos, que van desde la transformación química hasta la incorporación a las células o la formación de diferentes complejos (Gutiérrez Corona et al., 2010). En algunos casos intervienen interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, uniones covalentes, interacciones redox, precipitación extracelular o la combinación de varios de estos procesos (Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez, 2016).

En el caso de los hongos, las interacciones con el cromo más estudiadas han sido la biotransformación, enzimática o no, para reducir Cr^{6+} a Cr^{3+} , la biosorción y la inmovilización, caracterizadas por la unión pasiva del metal con componentes de la pared o la membrana celular y la bioacumulación, en la que ocurre la entrada del metal al interior de la célula con gasto de energía. Mediante mecanismos de homeostasis los hongos mantienen un balance entre la incorporación, expulsión y captura del metal (Gutiérrez Corona et al., 2010).

La captura de cromo en la superficie de hongos filamentosos y de levaduras, ha sido descrita como resultado de su unión con los polisacáridos de la pared celular, como glucanos, quitina y quitosano, los cuales pueden estar asociados con proteínas y otros componentes menores como lípidos y melaninas (Gadd, 1993, Pillichshammer et al., 1995). En otros casos se llegan a producir fenotipos de hipersensibilidad a Cr^{6+} como resultado de la alteración de la ATPasa vacuolar o de estructuras vacuolares que secuestran allí el cromo (Tait, Sayer, Gharieb, & Gadd, 1999) o bien por la alteración de proteínas que protegen del efecto oxidativo del Cr^{6+} como la alkil hidroperóxido reductasa (Nguyễn-nhu & Knoops, 2002), así como la Cu, Zn-superóxido dismutasa y la péptido metionina sulfóxido reductasa (Sumner et al., 2005).

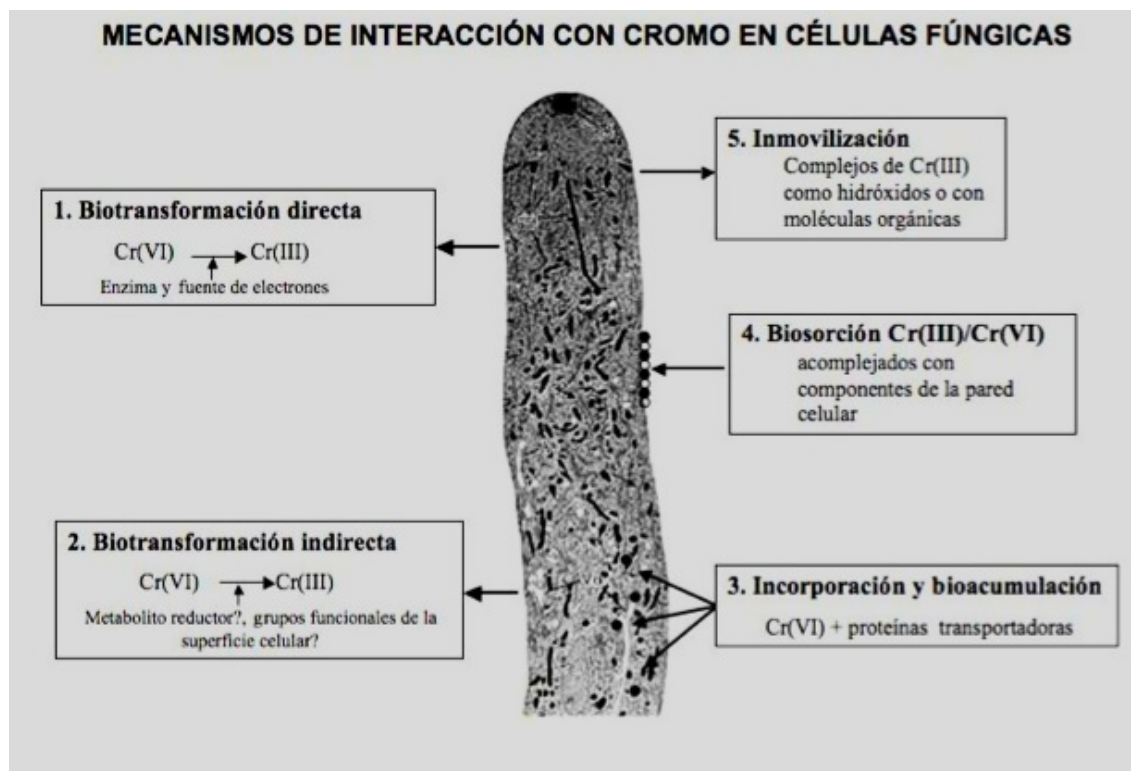


Ilustración 4. Mecanismos de interacción de biomasa fúngica llevados a cabo en la remoción del cromo. (Gutiérrez Corona et al., 2010)

Entre los hongos filamentosos también han sido descritos removiendo cromo, *Aspergillus versicolor* y *Aspergillus* spp., *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium* spp., (Acevedo et al., 2006, A. Das, Davis, & Rudel, 2008).

Las levaduras *Cándida maltosa*, *Cándida* spp. (Ramírez-Ramírez et al., 2004) y una cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* (Ksheminska, Honchar, Gayda, & Gonchar, 2006, Guillén-Jiménez, Morales-Barrera, Morales-Jiménez, Hernández-Rodríguez, & Cristiani-Urbina, 2008), así como *Lecythophora* sp. y *Aureobasidium pullulans* han sido reportadas como eficientes removiendo cromo (Villegas, Fernández, Amoroso, & de Figueroa, 2008).

Recientemente, se ha demostrado que en el genoma de algunos hongos filamentosos, mas no en levaduras, existen homólogos de la proteína bacteriana ChrA (Cervantes & Campos-García, 2007), la cual pertenece a la superfamilia de transportadores CHR, probablemente implicadas en el transporte de sulfato y cromato (Nies, 1999). En las bacterias *P. aeruginosa* y *Cupriavidus metallidurans* al parecer la proteína ChrA constituye un determinante de resistencia a Cr^{6+} funcionando como una bomba expulsora del ión (Cervantes & Campos-García, 2007, Ramírez-Díaz et al., 2008). La habilidad para la reducción de Cr^{6+} a Cr^{3+} ha sido encontrada en muchos géneros de bacterias como *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Microbacterium*, *Corynebacterium* y *Arthrobacter*, entre otras (Viti et al., 2003, Sharma & Adholeya, 2012).

La enzima cromoreductasa presente en *P. ambigua*, favorece la reducción de Cr^{6+} a Cr^{3+} pero es conocido además que otras reductasas como la DT-diaforasa, aldehído oxidasa, Citocromo P-450 pueden favorecer la reducción (Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez, 2016). Otros autores, señalan que además de la ChrR, enzimas como YieF, Nema y LpDH han sido encontradas tanto en la fracción soluble del citoplasma como en la membrana celular de bacterias en medios anaeróbicos o aeróbicos y en todos los casos la reducción enzimática involucra la transferencia de electrones y la subsecuente producción de especies de oxígeno reactivo (ROS). Los modos de

acción y mecanismos enzimáticos se han propuesto a la luz de los llamados mecanismos Clase I tight y Clase II semitight (Thatoi, Das, Mishra, Rath, & Das, 2014).

Acinetobacter sp. resultó promisorio en estudios de co-remediación de compuestos fenólicos y Cr^{+6} . Esta bacteria, al parecer tiene la facultad de utilizar el fenol como fuente de carbono y energía, pero cuando el medio en el que crece se enriquece con glucosa, desarrolla la habilidad de reducir cromo hexavalente adicionalmente (Bhattacharya, Gupta, Kaur, & Malik, 2014). Asatiani et al., (2004), evaluaron *Arthrobacter oxydans* obtenida de suelos de basalto de Columbia-USA altamente contaminados y confirmaron su capacidad remediadora después de 10 días de inoculación con Cr^{6+} ; así mismo determinaron el umbral no tóxico para cromo hexavalente en $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ en soluciones acuosas e hicieron importantes aportes acerca del mecanismo de remediación empleado por *A. oxydans* al interior de la pared celular en relación con el incremento proteico dentro de la misma. Bacterias de tipo azufre oxidativas conocidas como (SOB) han sido utilizadas también como biosensores por su alta capacidad para detectar concentraciones de Cr^{6+} menores a 50 ppb (Hassan, Van Ginkel, & Oh, 2012).

Cellulosimicrobium sp. fue reportada en aguas de curtiembres y evaluada en pruebas de reducción de Cr^{6+} a 50, 100, 200 y 300 mg L^{-1} ; reducciones de 99,33% y 96,98% a 50 y 100 mg L^{-1} fueron registradas a 24 y 96 h respectivamente. Las reducciones observadas a 200 y 300 mg L^{-1} fueron de 84.62% y 62.28% a 96 h (Bharagava & Mishra, 2018).

2.1.3. OBJETIVOS

Determinar el potencial efecto cromotolerante generado por adiciones crecientes de Cr^{6+} en microorganismos incubados en MML y evaluados en presencia de difenilcarbazida.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar la metodología del uso de la difenilcarbazida para evaluar el contenido de Cr^{6+} removido por biomasas fúngicas o bacteriales creciendo en MML y Agar Nutritivo (AN) enriquecidos con cromo.
- Evaluar tres organismos exógenos reportados como cromotolerantes y dos bacterias nativas, aisladas de colectores de aguas residuales cromadas de la empresa Curtiembres de Itagüí, con el propósito de utilizarlos en posteriores ensayos como biosensores o bioremediadores de residuos con presencia de cromo.

2.1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

- SITIO EXPERIMENTAL

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Ecología y Conservación Ambiental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, Sede de Medellín: Latitud: $6^{\circ} 15' \text{ N}$, Longitud $75^{\circ} 35' \text{ W}$, Altitud 1495 m. Precipitación 1650 mm año^{-1} , Temperatura 21°C , Brillo solar 1800 h año^{-1}

- OBTENCIÓN DE MICROORGANISMOS

Algunos de los microorganismos reportados en la literatura como cromotolerantes fueron suministrados por la academia y otros por la empresa privada. El profesor Walter Osorio de la

Universidad Nacional aportó los hongos *Aspergillus niger* y *Rhizobium* sp., el profesor Camilo Ramírez de la Universidad de Antioquia suministró la cepa de *Bacillus subtilis*. La empresa de biotecnología Natural Control contribuyó con el hongo *Paecilomyces lilacinus* y la empresa Soluciones Microbiales del Trópico, la cepa de *Paecilomyces* sp. Las bacterias nativas fueron aisladas de los cárcamos o colectores industriales de Curtiembres de Itagüí en los que se aislaron numerosos morfotipos y de los cuales se seleccionaron dos de ellos para éste ensayo, por su capacidad evidente para generar esporulados en presencia de cromo.



Ilustración 5. Recolección de muestras de aguas residuales con presencia de cromo. Curtiembres Itagüí.

- MEDIO DE CULTIVO

Se partió del método desarrollado por Cárdenas y Acosta (2010) quienes trabajaron con el medio mínimo de Lee et al., (1975): K_2HPO_4 : 2.5 g; $MgSO_4$: 0.2 g; $(NH_4)_2SO_4$: 5.0 g; NaCl : 5.0 g; peptona de caseína al 0.1 %; en H_2O 1.0 L. Para este ensayo la peptona de caseína fue reemplazada por peptona pura y el sulfato de amonio fue substituido por tiosulfato de amonio en las mismas concentraciones por disponibilidad de reactivos.

- PROCEDIMIENTO

En Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, se dispusieron separadamente cantidades crecientes de Cr^{3+} y Cr^{6+} (0 - 2000 mg L^{-1}) usando para ello sal básica de cromo ($CrOHSO_4$) como fuente de Cr^{3+} y dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) como fuente de Cr^{6+} .

Los Erlenmeyer fueron inoculados con *Bacillus subtilis*, *Rhizobium* sp., *Paecilomyces lilacinus*, y los esporulados bacterianos denominados aquí *ETCR 10* y *CC 13* codificadas como cepas nativas. Una cepa de *Aspergillus niger*, fue utilizada para la calibración inicial.

Previamente los materiales aislados de la empresa Curtiembres de Itagüí se multiplicaron en Papa Dextrosa Agar (PDA) para los hongos y Agar Nutritivo (AN) para las bacterias; ambos durante 7 días; posteriormente los hongos se suspendieron en agua estéril destilada y las bacterias se llevaron directamente al medio mínimo de Lee modificado hasta alcanzar la concentración deseada (10^6 UFC mL^{-1}).



Ilustración 6. Cepa de *Aspergillus niger* evaluada por su capacidad de remoción de Cromo. .

Cada uno de ellos se inoculó separadamente en 100 mL del medio mínimo de Lee (MML) a razón de 1 mL de una suspensión microbial que contenía 10^6 UFC mL⁻¹ y fueron adicionadas cantidades crecientes de cromo.

La incubación duró 7 días en continua agitación (100 rpm) y 28° C. Posteriormente se determinó la biomasa microbial por filtración en papel filtro ($< 0.5 \mu\text{m}$) y se llevó a 60 °C durante 24 horas.



Ilustración 7. Incubación de bacterias aisladas de aguas de curtiembres en Medio Mínimo de Lee a 100 rpm y 28°C.

Para determinar la concentración de Cr^{6+} se empleó el método colorimétrico de la difenilcarbazida que desarrolla coloración violeta a una longitud de onda de 540 nm empleando para ello el espectrofotómetro Thermo Spectronic Génesis 20[®]. El procedimiento consistió en tomar el filtrado y centrifugarlo a 3000 RPM por 5 min, luego se tomó del sobrenadante 1.0 mL y se hicieron diluciones seriales hasta 10^{-4} tanto para *B. subtilis*, *Rhizobium* sp y *Paecilomyces* sp. como para las cepas bacterianas colectadas en curtiembres (ETCR10 y CC13).

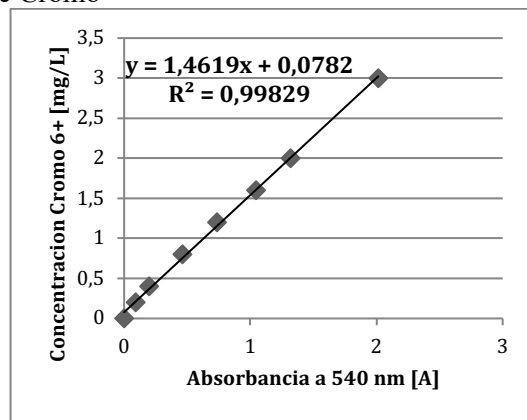
De la dilución final se tomaron 5.0 mL y se agregaron 0.5 mL de H_2SO_4 al 50 %, 0.1 mL de ácido fosfórico al 85% y 1.0 mL de difenilcarbazida al 0.2% (p/v) en etanol absoluto. Luego de 10 min se determinó la absorbancia de la solución a 540 nm.

El diseño experimental fue completamente al azar. Los tratamientos tuvieron un arreglo factorial 5×7 ; esto es, 5 especies bioremediadoras de cromo y 7 dosis de Cr^{6+} (0, 200, 400, 800, 1200, 1600 y 2000 mg Cr^{6+} L⁻¹). Cada tratamiento tuvo 3 réplicas y un blanco sin microorganismos. Los resultados fueron evaluados a través de un análisis de varianza en el cual la variable cuantitativa estuvo representada por la dosis de cromo y la cualitativa por la especie de bioremediador. La concentración de cromo se estimó a partir de la siguiente ecuación:

$$y = mx + b$$

Donde:

- m es la pendiente
 b es la ordenada al origen
 x es la absorbancia
 y la concentración de Cromo

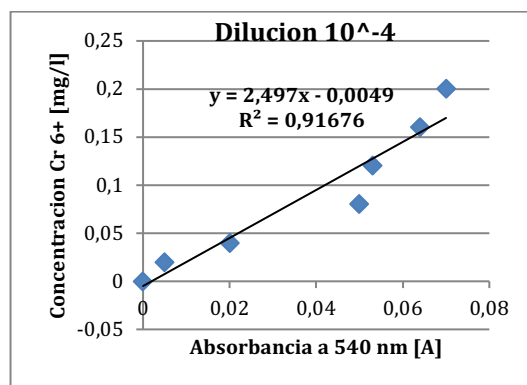


Ecuación No.1 Curva de calibración de Cr^{6+} realizada sobre biomasa de *A. niger* en agua destilada

Para calibrar el método se utilizó una cepa del hongo *Aspergillus niger* en una dilución 1×10^{-3} en agua destilada, reconocido por su habilidad para remover Cr^{6+} .

La ecuación $y = 1.4619x + 0.0782$ (ecuación No. 1) corresponde a la curva del cromo removido por *Aspergillus niger* usada para calibración del método. A partir de ésta curva se decidió aumentar las concentraciones para *Bacillus*, *Rhizobium* y *Paecilomyces* a 1×10^{-4}

De igual manera para los microorganismos indígenas colectados en Curtiembres de Itagüí, la ecuación utilizada fue la que aparece en la gráfica como ecuación No. 2 cuya calibración se realizó con una dilución de 10^{-4} , sobre el medio mínimo de Lee.



Ecuación No.2 Curva de calibración de Cr^{6+} en bacterias sobre Medio Mínimo de Lee

2.1.5. RESULTADOS

Se presentan los resultados obtenidos relacionados con la remoción de Cr^{6+} de tres biomásas de microorganismos conocidos, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium* sp. y *Paecilomyces lilacinus* y dos esporulados bacteriales desconocidos, *ETCR 10* y *CC 13*, todos ellos cultivados en MML y AN, enriquecidos con diferentes concentraciones de cromo.

Además de comparar la capacidad de reducción de cromo de las especies indígenas frente a cepas exógenas se pretendió estandarizar la metodología para determinar Cr^{6+} utilizando el método colorimétrico de la 1,5 difenilcarbazida, cuando actúa como acomplejante del Cr^{6+} en solución, el

cual es reconocido como confiable y relativamente económico y ante la necesidad de evaluar un copioso e indeterminado número de muestras en las pruebas subsiguientes, se hacía necesario estandarizar y ajustar la metodología.

La tabla 2 resume los valores correspondientes a la reducción de Cr^{6+} a Cr^{3+} de los cinco microorganismos evaluados.

Tabla 2. Reducción de Cr^{6+} a Cr^{3+} por *Bacillus*, *Rhizobium*, *Paecilomyces* y los esporulados bacterianos ETCR 10 y CC13.*

CONCENTRACIÓN / MICROORGANISMO		BACILLUS	%	RHIZOBIUM	%	PAECILOMYCES	%	ETCR 10	%	CC13	%
200 PPM Cr^{6+}	concentración final	194.66		221.47		233.65		84.85		0	
	reducción	5.34	3	-21.47	-11	-33.65	-17	115.15	58	200	100
400 PPM Cr^{6+}	concentración final	198.08		232.67		244.86		109.82		11.14	
	reducción	201.92	50	167.33	42	155.14	39	290.18	73	388.36	97
800 PPM Cr^{6+}	concentración final	319.41		463.65		406.64		342.87		226.35	
	reducción	480.59	60	336.35	42	393.36	49	457.13	57	573.65	72
1200 PPM Cr^{6+}	concentración final	549.42		520.18		526.52		542.63		367.84	
	reducción	650.58	54	679.82	57	673.48	56	657.37	55	832.16	69
1600 PPM Cr^{6+}	concentración final	735.57		739.47		695.12		642.51		675.81	
	reducción	864.43	54	860.53	54	904.88	57	957.49	60	924.19	58
2000 PPM Cr^{6+}	concentración final	1034.28		1020.15		971.42		575.93		1150.24	
	reducción	965.72	48	979.85	49	1028.58	51	1424.07	71	849.76	42

(*) ETCR 10 y CC13 corresponden a esporulados bacteriales no identificados

2.1.6. DISCUSIÓN

Los cifras correspondientes a concentración final y reducción de Cr^{6+} representan los promedios de tres replicaciones por cada dosis evaluada de Cr^{6+} . Los valores originales para cada replicación pueden verse en el anexo A-1 en el cual la columna correspondiente a *concentración final* se refiere al remanente de cromo que resulta en los Erlenmeyer después de todo el procedimiento descrito anteriormente. La diferencia con la concentración inicial de cromo, es denotada en la columna *reducción* y se asocia con la remoción del microorganismo, posible transformación iónica a formas más reducidas y pérdidas del sistema.

Puede apreciarse que en el caso de *B. subtilis* en concentraciones de 200 mg L⁻¹ de Cr^{6+} la remoción fue del 3 %, en tanto que en concentraciones de 800 mg L⁻¹ de Cr^{6+} la reducción alcanzó el 60 %. Al incrementar la concentración entre 1200 y 1600 mg L⁻¹ de Cr^{6+} , la remoción decreció hasta el 54 % y al alcanzar los 2000 mg L⁻¹, cayó a niveles del 48 %. Cuando la bacteria creció en medios enriquecidos con Cr^{3+} , no sé reportaron reacciones ni presencia de color violeta al entrar en contacto con la difenilcarbazida.

Merece resaltarse que en las lecturas de los testigos o blancos, que aparecen en las tablas anexas (A-1) con filas resaltadas en gris y que corresponden al medio mínimo de Lee, sin la adición de ningún microorganismo, se presentan reducciones altas. Aún en la dosis de 2000 mg L⁻¹ de Cr^{6+} , se observa una reducción cercana al 50 % en el testigo, similar a la remoción en presencia de la bacteria en esa concentración.

Los valores de remoción del Cr^{6+} a Cr^{3+} de la especie *Rhizobium* son muy similares a los reportados para *Bacillus*. Nuevamente en 200 mg L^{-1} de Cr^{6+} la remoción es baja, pero a medida que se incrementa la concentración, aumenta la capacidad para remover el metal. Es posible que algunos organismos tengan la propiedad de actuar como facultativos o como se mencionó, que en concentraciones altas, aumenten significativamente su potencial de remoción.

Los testigos en 800, 1600 y 2000 mg L^{-1} de Cr^{6+} , remueven aproximadamente las mismas cantidades de sus tratamientos homólogos en presencia de *Rhizobium*. En este caso la mayor remoción asociada a la bacteria estaría dada para las concentraciones de 1600 y 2000 mg L^{-1} de Cr^{6+} , con remociones de 860 y 979 mg L^{-1} de Cr^{6+} respectivamente en 96 h. Esta situación se repitió con otros microorganismos como se verá y además confirma lo reportado por otros autores en relación con la capacidad de algunos microorganismos que incrementan su capacidad de remoción a medida que aumentan las concentraciones.

La Tabla 2 presenta también los valores de Cr^{6+} removidos por el hongo *Paecilomyces lilacinus*. El comportamiento es similar a *Bacillus* y *Rhizobium* y de nuevo la remoción de los testigos a 800, 1600 y 2000 mg L^{-1} de Cr^{6+} fue ligeramente superior que sus similares en presencia del hongo. Aunque se lograron conseguir reducciones entre 50 y 57 % en las concentraciones altas, no hay una diferencia estadística significativa y se aparta de lo reportado por Cárdenas y Acosta (2010) quienes consiguieron reducciones de la forma hexavalente a la trivalente del 100%. Lo anterior generó expectativa con este hongo en particular desde el comienzo y por tanto se optó por buscar una nueva cepa para los ensayos subsiguientes, que a la postre, aunque resultó promisorio para avanzar hasta las fases finales, sus resultados fueron significativamente inferiores a los reportados por los citados autores.

La capacidad de remoción de los esporulados bacteriales provenientes de Curtiembres de Itagüí, distinguidos con los códigos ETCR 10 y CC13 son reportados también en la tabla 2. Ambas formas bacteriales siguen el patrón mostrado por *Bacillus*, *Rhizobium* y *Paecilomyces*, pero con porcentajes de remoción más altos que éstos, especialmente para ETCR 10 en las concentraciones de 1600 y 2000 mg L^{-1} de Cr^{6+} con remociones del 60 y 71 %. El biotipo CC13 fue el único microorganismo que mostro una reducción del 100 y 97 % en concentraciones de 200 y 400 mg L^{-1} de Cr^{6+} respectivamente; al incrementar a 800 mg L^{-1} , la reducción se reduce al 72 % y termina con remociones del 58 % a 1600 mg L^{-1} y 42 % a 2000 mg L^{-1} de Cr^{6+} . La forma trivalente, no sufrió oxidaciones al igual que con *Bacillus*.

La reducción de Cr^{6+} observada en todos los tratamientos testigos que no contenían microorganismos, llama la atención y podría estar asociada a la naturaleza ácida del MML. Kotaś & Stasicka, (2000), observan que algunos compuestos azufrados pueden contribuir a la reducción y ésta habría sido la razón principal para modificar el MML reemplazando el sulfato de amonio. Ésta situación no permite separar la reducción asociada a la acción microbial. Algunos autores como Cárdenas y Acosta, (2010) que han usado este medio de cultivo, reportan altas tasas de reducción de Cr^{6+} asociadas a una cepa de *Paecilomyces* sp. pero no presentan lecturas de la reacción del MML con difenilcarbazida en ausencia de microorganismos. También Smiley Sharma & Malaviya, (2016) utilizaron el MML (0.25% KH_2PO_4 , 0.20% MgSO_4 , 0.50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 0.50% NaCl) sin adición de glucosa y usando como fuente de carbono únicamente los materiales orgánicos presentes en las aguas residuales de curtiembres en el medio de cultivo hasta 72 h. Finalmente recurrieron a adicionar a este medio de cultivo un medio mínimo de sal (MMS) y mantuvieron el pH en 5.3 con una solución buffer de fosfato-citrato. Éstos autores recurrieron a múltiples pruebas hasta llegar a la estandarización del método. La determinación del cromo hexavalente también fue llevada a cabo por el método de la difenilcarbazida.

En este ensayo, todos los microorganismos removieron o ejercieron alguna acción reductora del Cr^{6+} adicionado a su medio de cultivo a diferentes concentraciones, pero no puede afirmarse cuanto se debe al potencial reductor microbial y cuanto al potencial oxidoreductor del medio. En

consecuencia el MML, no parece ser el medio apropiado para cultivar y evaluar la capacidad de los microorganismos con potencial bioremediador, de cromo en particular. En los ensayos subsiguientes se procederá a evaluar otros medios de cultivo. Como puede apreciarse en el anexo A-2, que detalla el informe estadístico corrido en R (3.5.1), el ANOVA reportó diferencia estadística altamente significativa tanto para el factor bioremediador, como para el factor dosis de Cr^{6+} y para la interacción bioremediador * dosis de cromo.

La gráfica siguiente asociada a los valores de la tabla 2, reportada por el programa R, permite ver claramente que el biotipo bacteriano indígena CC13 presenta la mayor efectividad para remover cromo en las concentraciones 200, 400, 800 y 1200 mg kg^{-1} de Cr^{6+} superando a todos los demás microorganismos y que solo el biotipo indígena ETCR 10 logra superarlo levemente en 1600 mg kg^{-1} y de manera sustancial en la concentración de 2000 mg kg^{-1} , confirmando así que los aislados microbiológicos aislados en la fuente Curtiembres de Itagüí, presentan un comportamiento remedidor significativamente superior a *Bacillus*, *Rhizobium* y *Paecilomyces*.

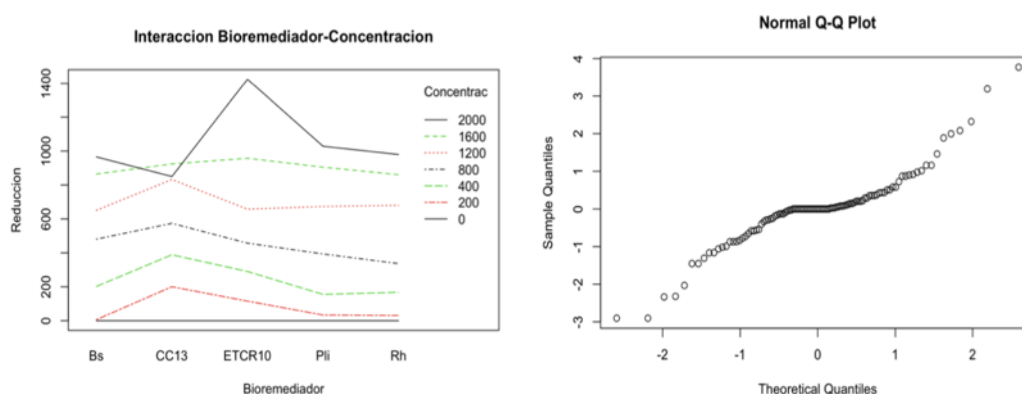


Ilustración 8. (IZQ.) Reducción de Cr^{6+} ppm (eje y) por microorganismo Bs : *Basillus*, biotipos bacteriale ETCR10 y CC13. Ps: *Paecilomyces*. Rh: *Rhizobium* para dosis desde 0-2000 ppm de Cr^{6+} . (Derecha). Prueba de normalidad Q-Q plot Programa R 5.3.1

No es objeto de esta primera fase evaluar que tipo de mecanismos operan en el proceso de remoción, si ésta se da por adsorción del ión a la membrana celular o absorción a través de ella y entrada al citoplasma con gasto de energía o si opera algún tipo de mecanismo acomplejante y/o ligante. En un experimento posterior de esta investigación, se intentará dilucidar al microscopio electrónico de barrido (SEM) si el metal es absorbido o no a nivel citoplasmático.

Otro aspecto que merece atención se refiere a la posible oxidación que se presentó de manera ininterrumpida. El potencial y la cinética redox en este metal es diferente para las especies trivalente y hexavalente. Cr^{3+} presenta una velocidad más lenta para oxidarse que Cr^{6+} para reducirse. En el primer ensayo con *B. subtilis* y en el último con CC13, se observó en las lecturas de los tratamientos que contenían sólo Cr^{3+} que no había reacción con la difenilcarbazida a ninguna concentración, permitiendo afirmar que el proceso de oxidación de Cr^{3+} a Cr^{6+} no se daba en este caso. No obstante, esto no se cumplió para *Rhizobium*, *Paecilomyces* y ETCR 10, mostrando reacción con difenilcarbazida y confirmando la presencia inequívoca de Cr^{6+} , lo cual sería una evidencia de oxidación. Es posible que la agitación permanente en los shakers o la centrifugación para obtener el sobrenadante, propicien condiciones redox diferentes que afecten la cinética “natural” pudiendo alterar los resultados. Lo anterior confirmaría la encontrado por otros autores, que sostienen que las mismas condiciones que favorecen la reducción, favorecen también la oxidación (Apte, Verma, Tare, & Bose, 2005, Brose & James, 2008, Labunska et al., 2000, Kotaś & Stasicka, 2000, Kumral, 2007, Sharma & Adholeya, 2012).

Parece necesario hacer lecturas a tiempos mucho más cortos y empezar desde las primeras horas de la incubación. Algunos investigadores, sostienen que la cinética de reducción del cromo se da en las primeras 50 horas y que luego de este tiempo la curva se hace totalmente asintótica. Es posible que experimentos tan largos, con medios nutritivos limitados por agotamiento en superficie y en un sistema cerrado, no favorezcan la multiplicación y se ponga en riesgo la supervivencia de los microorganismos y ello dificulta el entendimiento de la ruta que pueda tomar el cromo si no hay análisis de la biomasa comprometida y sin un adecuado balance de masas que involucre lo que queda adsorbido a los Erlenmeyer, filtros, pérdidas del sistema, etc., como se constató al final del experimento.

Sin embargo los objetivos de explorar microorganismos indígenas en aguas residuales cromadas que pudieran remover cromo hexavalente y resolver asuntos relacionados con la estandarización del método para evaluar Cr^{6+} mediante el uso de difenilcarbazida permite avanzar hacia la búsqueda y caracterización de los microorganismos más eficientes,

2.1.7. CONCLUSIÓN

El empleo de microorganismos indígenas hallados en las fuentes de la contaminación con residuos cromados, hace posible contemplar la bioremediación como alternativa para la reducción y/o remoción de Cr^{6+} a Cr^{3+} de una forma rápida, económica y ecoeficiente.

2.2. Capítulo B

Herramientas biotecnológicas para aislar, cultivar y caracterizar microorganismos con capacidad para remover cromo.

La información contenida en éste capítulo no ha sido publicada aún en ninguna revista científica. Ésta información está en proceso de edición para ser publicada como tesis de maestría de la estudiante Luisa María Quiróz, y es propiedad del equipo de trabajo constituido por los profesores Sergio Ordúz, Olga Montoya, Simón Ruiz, asociados a la Universidad Nacional, la candidata a Magister Luisa Quiróz y el Doctorando Juan Vélez.

2.2.1. RESUMEN

El experimento descrito en el Capítulo A, permitió entender algunos procesos para avanzar en la exploración de nuevos aislados bacteriales y elegir las fuentes de búsqueda para nuevos microorganismos, así como estandarizar el método para medir Cr^{6+} mediante el uso de difenilcarbazida. Las pruebas precedentes llevaron a la conclusión de que la naturaleza ácida del medio mínimo de Lee, podría generar reducciones de cromo no asociadas a la acción microbiana, obligando a la exploración de nuevos medios de cultivos para los microorganismos. También permitió confirmar que aislados indígenas que provienen de las fuentes contaminadas con cromo, muestran una mayor cromotolerancia y posible potencial para remover cromo de sitios o materiales contaminados con este metal. Se procedió entonces a explorar nuevos microorganismos obtenidos directamente en dichas fuentes.

Se realizaron aislados del biosólido de la PTAR San Fernando, se introdujo un hongo ambiental hallado como contaminante de cajas Petri enriquecidas con cromo y aleatoriamente se aislaron hongos fitopatógenos presentes en cultivo del cacao para observar y contrastar su actividad reductora de Cr^{6+} a Cr^{3+} . Así mismo se realizaron nuevos aislados de la empresa Curtiembres de Itagüí, para comparar la actividad fúngica y bacteriana para seleccionar al final los materiales más promisorios cromotolerantes y pasar a la fase de invernadero (Capítulo C), previa identificación mediante el Biolog MicroStation System, el protocolo API para caracterización bioquímica y la secuenciación molecular. Por estos métodos se identificaron 13 microorganismos, cinco especies de hongos y ocho especies de bacterias todos con potencial para reducir o remover cromo.

También se exploró el uso del microscopio electrónico de barrido para observar si el cromo era absorbido al interior de la célula, después de haber crecido en un medio enriquecido con este metal.

2.2.2. ESTADO DEL ARTE

Recientemente se ha estudiado el aislamiento de microorganismos resistentes y su capacidad de remoción y/o reducción de Cr^{6+} a partir de sitios contaminados con este metal, como ocurre con la bacteria *Corynebacterium hoagii* (Viti et al., 2003) y *Staphylococcus saprophyticus* (Semra et al., 2004), las levaduras *Candida maltosa* (Ramírez-Ramírez et al., 2004), *Candida* sp., (Guillén-Jiménez, et al., 2008) y los hongos filamentosos *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., (Acevedo et al., 2008, Fukuda, et al., 2008), *Trichoderma inhamatum* (Morales-Barrera & Cristiani-Urbina, 2007) y *Aspergillus niger* (Coreño-Alonso et al., 2014, Khambhaty, et al., 2009).

La habilidad para la reducción de Cr^{6+} a Cr^{3+} ha sido encontrada en muchos géneros de bacterias

tales como *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Microbacterium*, *Corynebacterium* y *Arthrobacter*, entre otras (Viti et al., 2003, Sharma & Adholeya, 2012).

Morales-Barrera & Cristiani-Urbina (2007) hallaron que *Trichoderma inhamatum*, aislado de efluentes de la industria curtiembre en México, fue capaz de transformar cromo hexavalente en trivalente.

Recientemente fueron halladas tres especies del género *Bacillus*, entre ellas *B. subtilis* con reducciones hasta del 98% de Cr^{6+} a Cr^{3+} (Seema Sharma & Adholeya, 2012). En un estudio similar Verma et al., (2010) encontraron que *B. brevis* tenía una alta capacidad de reducción y resistencia a Cr^{6+} . Algunas bacterias Gram-positivas han demostrado ser más cromotolerantes que las Gram-negativas (Viti et al., 2003).

La tabla 3 resume la actividad de algunos investigadores en diferentes países, trabajando en los últimos años en la remoción o reducción de cromo, con gran diversidad de organismos.

Tabla 3. Especies microbianas con potencial remediador de cromo explorados en la última década por varios autores en diferentes países.

Año	AUTORES	PAIS	MICRORGANISMOS
2010	Shakoori, Tabassum & Rehman.	Pakistán	<i>Bacillus pumilus</i> ; <i>Alcaligenes fecalis</i> ; <i>Staphylococcus</i> sp.
2011	Cárdenas-González et al.	México	<i>Paeielomyces</i> spp.
2015	Mahmoud, Yakout, Abdel-Aal & Osman.	India	<i>Amphibacillus</i> spp. ; <i>Pseudomonas</i>
2013	Javaid & Sultan.	Pakistán	<i>Streptomyces</i> sp. (RSF17); <i>S. mutans</i> (BG5); <i>S. vinaceus</i> (CRF2); <i>S. griseoincarnatus</i> (SCF18)
2013	Rai, Singh, Upadhyay, Verma.	India	<i>Clorella vulgaris</i>
	Singh, Verma, & Gaur.	India	<i>Trichoderma viridae</i>
2013	Ahluwalia & Goyal.	India	<i>Aspergillus terreus</i>
2014	Pan et al.	China	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633
2014	S. Das et al.	India	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
2015	Wang et al.	china	<i>Pannonibacter phragmitetus</i>
2015	Huang, Wang & Liu.	China	<i>Lactobacillus paracase</i> CL1107, <i>Serratia</i> Spp.
2015	Sandana, et al.	India	<i>Bacillus methylotrophicus</i>

El complejo *Pseudallescheria boydii* que comprende patógenos ambientales con *Scedosporium* en estados anamorfos ha sido recientemente subdividido en cinco especies: *Scedosporium dehoogii*, *S. aurantiacum*, *Pseudallescheria minutispora*, *P. apiosperma* y *P. boydii*. Varias especies de *Pseudallescheria* y *Scedosporium* son organismos indicadores de contaminación en suelos y aguas. *Scedosporium dehoogii* en particular está asociado a suelos contaminados por hidrocarburos alifáticos (Lackner, Najafzadeh, Sun, Lu, & Hoog, 2012).

2.2.3. OBJETIVO

Evaluar la microbiota nativa cromo-tolerante presente en los biosólidos de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) San Fernando, con capacidad para biorremediar cromo y caracterizar los microorganismos más promisorios para ser evaluados *in-situ*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el crecimiento de los aislados microbiológicos con potencial remediador en diferentes medios de cultivo.
- Determinar la capacidad de reducción o remoción de cromo por parte de los microorganismos aislados.
- Caracterizar e identificar bioquímica y molecularmente los aislados con mejor potencial de tolerancia al cromo.
- Confirmar mediante exploraciones con el microscopio electrónico de barrido si la captura del cromo por algunas bacterias es activa o pasiva.

2.2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

• SITIO EXPERIMENTAL

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos de la Universidad Nacional sede de Medellín que coordina la Profesora Asociada Olga Montoya. Bajo su acompañamiento y dirección, la estudiante Luisa Quiróz adelantó su Tesis de Maestría, generando así resultados parciales para el avance de ésta Tesis Doctoral.

En el Laboratorio de Suelos se llevaron a cabo los ensayos de reducción y medición de cromo hexavalente. En el Laboratorio de Prospección y Diseño de Biomoléculas se prepararon las bacterias para su caracterización.

Los hongos fueron caracterizados en el laboratorio de Genómica, Transcriptómica y Proteómica del Sistema de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia.

• OBTENCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Los aislados microbianos tolerantes a altas concentraciones de cromo fueron obtenidos de los biosólidos de la PTAR San Fernando, ubicada en el municipio de Itagüí, Antioquia, Colombia. Las muestras correspondieron a los meses de Septiembre 2015 y Mayo 2016, con concentraciones de cromo de 214.33 mg Kg⁻¹ bs y 133.8 mg Kg⁻¹ bs respectivamente fueron empleadas para obtener los aislados.

• MEDIOS DE CULTIVO

Se suspendieron 10 g de biosólidos en 90 mL de agua peptonada al 0.1 % p/v a temperatura ambiente y agitación durante 1 h a 100 rpm. Alícuotas de 100 µL fueron adicionadas a papa-dextrosa-agar (PDA) y agar nutritivo (AN) por agotamiento en superficie. Se adicionó dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) al 99% a concentraciones finales de 200, 400, 500, 600, 800 y 1000 ppm de Cr⁶⁺ (Cárdenas-González, Martínez-Juárez, & Acosta-Rodríguez, 2011). Se

incubaron a 35°C por 3 días y posteriormente a temperatura ambiente durante 4 días para proceder a realizar el aislamiento.

La muestra de biosólidos del mes de mayo, fue suspendida 1:10 en agua con peptona 0.1 % p/v inoculada en extracto de malta-peptona-glucosa (MEB) 15-2-15 g L⁻¹ respectivamente, enriquecido con Cr⁶⁺ a 500, 600 y 800 ppm, se procedió a los ensayos de reducción de cromo y las suspensiones se cultivaron en AN y PDA a 0, 500, 600 y 800 ppm de Cr⁶⁺.

Cada uno de los diferentes aislados bacterianos se conservaron en glicerol al 20 % v/v usando caldo nutritivo como base y se almacenaron a -20 °C. Los hongos se almacenaron en tubos falcón de 15 mL en solución salina 0,85 % a 4°C sin congelación ni glicerol.

Previo reactivación de los aislados se determinó la concentración máxima inhibitoria (CMI) de cromo, a temperatura ambiente, durante 24 h para bacterias y 7 días para hongos. Los medios AN y PDA enriquecidos con 100 ppm Cr⁶⁺ fueron incubados con alícuotas de los aislados microbiales y adicionados con 50 y 100 ppm de Cr⁶⁺ para bacterias y hongos respectivamente cada vez que se reportó crecimiento, hasta alcanzar la inhibición, sin superar en ningún caso 1400 ppm.

Los hongos cultivados en matraz-Erlenmeyer (70 mL vol. de trabajo), en caldo MEB a 800 ppm de Cr⁶⁺ (3 replicaciones), se incubaron a temperatura ambiente durante 5 días, a 100 rpm, en agitador orbital (Lab. Companion SI-300). Se tomaron alícuotas de 4 mL a las 0, 48, 72 y 96 h, filtradas y almacenadas a 4°C y determinado el cromo para los aislados fúngicos Sld 9, Sld 11, Sld 13, Sld 14, provenientes de biosólidos de la PTAR San Fernando.

Las bacterias se cultivaron en caldo Luria Berthani (LB), NaCl-Peptona-extracto de levadura (5-10-5 g L⁻¹) enriquecido con 100 ppm de Cr⁶⁺, por triplicado; incubado a 35 ° C durante 24 horas a 100 rpm en matraces de 100 mL y volumen de trabajo de 20 mL en agitador orbital. Muestras de 1 y 5 mL fueron tomadas a 0, 24, 48 y 96 h , centrifugadas a 10000 rpm por 25 min (Labnet International.inc) aislado el sobrenadante y almacenadas a 4° C para determinar cromo a las 24 h.

- DETERMINACIÓN DEL CROMO

Para la determinación de la concentración de cromo total en el caso de las bacterias, se procedió centrifugando a 10000 rpm el caldo bacteriano y del sobrenadante se tomó una alícuota de un 1 mL a la cual de le adicionó una gota de ácido nítrico para bajar el pH a 2 y estabilizar el cromo durante la determinación. Para el caso de los hongos, se reemplazó la centrifugación por filtración en filtro de nitrocelulosa, la dilución se llevó hasta 3 ppm de Cr y se estabilizó igualmente con ácido nítrico. Las lecturas se realizaron por emisión atómica (Agilent Technologies 4100 MP-AES) y los datos se colectaron en MP Expert versión 1.5.1.6821. El cromo hexavalente se determinó mediante el método colorimétrico de difenilcarbazida a 540 nm siguiendo el protocolo EPA 7196A, (espectrofotómetro de UV vis Perkin Elmer Lambda 25).

- CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Para las bacterias con mejores resultados de reducción de cromo, se realizó una curva de crecimiento en caldo LB adicionado con 100 ppm Cr⁶⁺ a 37 ° C durante 48 horas. Cada hora se determinó la absorbancia por espectrofotometría (Multiskan go TM Thermo Scientific) a 540 nm previa agitación cada 40 minutos antes de la lectura.

- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

La caracterización molecular tuvo lugar en el SIU de la Universidad de Antioquia. Se llevó a

cabo la extracción de DNA y la identificación de hongos por secuenciamiento y análisis de las regiones ITS1 e ITS2. La extracción del DNA se realizó usando el kit de Norgen *Plant/Fungi DNA Isolation Kit*. Al finalizar el proceso de extracción, se hizo la cuantificación del DNA por el método de absorción de luz a 260 nm (Nanodrop).

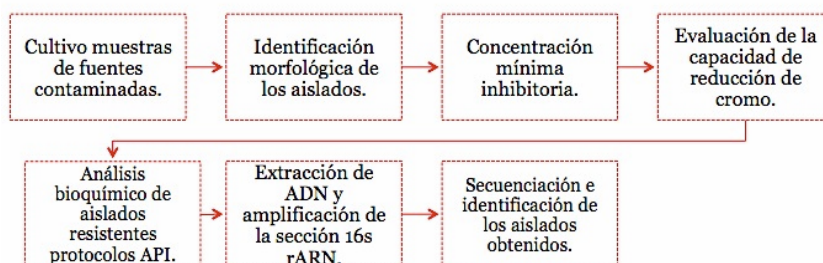
Para el análisis filogenético de las secuencias, se usó el paquete MEGA versión 6.0 ; se realizó matriz de distancias y para la construcción del árbol filogenético se utilizaron los métodos de *Neighbor joining* y máxima verosimilitud con 1000 réplicas de “bootstrap”.

- OTRAS HERRAMIENTAS DE DETERMINACIÓN

Se llevó a cabo también una caracterización bioquímica para bacterias mediante el protocolo API método 50CHB V4. Así mismo se corrió una prueba para identificación de algunos microorganismos mediante el Biolog Microstation Id System, con el cual se identificaron algunos hongos y bacterias.

Se realizaron pruebas SEM-EDS al microscopio electrónico para *Staphylococcus saprophyticus* y *Bacillus subtilis* en caldo enriquecido a 100 ppm Cr^{6+} a temperatura ambiente por 24 h. El cultivo se ajustó a una DO600 (densidad óptica en 600 nm) de 0.1. Las muestras se filtraron usando membranas de celulosa de 0.2 micrómetros utilizando bomba de vacío y fueron sumergidas en glutaraldehído al 2.5% por 8 h y refrigeradas a 4 - 8 °C. Pasado ese tiempo, las bacterias fijadas a la membrana se lavaron con solución salina buffer fosfato (PBS) por 5 min y agua destilada. Se deshidrataron luego con etanol a diferentes concentraciones 50, 75 y 96% por 10 min y se suspendieron en etanol al 100% hasta punto del secado crítico. Los filtros se almacenaron en platos de 12 pozos y se recubrieron en oro para determinar las lecturas al microscopio electrónico de barrido.

- RESUMEN METODOLÓGICO



- ANÁLISIS DE DATOS

El porcentaje de reducción de cromo hexavalente fue sometido a un ANOVA corrido en R-core team (2017); los resultados se escrutaron bajo una agrupación de medidas HDS de Tukey de comparaciones múltiples y sometidos a una prueba de Normalidad de residuales siguiendo el test Shapiro y prueba de homogeneidad de varianza en el test Levene.

2.2.5. RESULTADOS

Las Tablas 4 y 5 muestran los principales hongos y bacterias aislados de biosólidos de la PTAR San Fernando que fueron seleccionados por su habilidad para crecer en medios ricos en cromo. Se aislaron 16 cepas de hongos de los biosólidos, tolerantes entre 400 y 800 ppm Cr^{6+} . Así mismo se obtuvieron 32 cepas bacterianas con tolerancia entre 400, 500 y 600 ppm de Cr^{6+} .

Mediante el procedimiento descrito pra hallar la CMI se seleccionaron los materiales fúngicos más tolerantes a Cr^{6+} y para las bacterias se recurrió a curvas de crecimiento bacteriano, buscando las más cromotolerantes. Con los materiales más promisorios de estas pruebas, se corrió un ANOVA (ver anexo B-2) para determinar finalmente los que irían a secuenciación.

- RESUMEN DE HONGOS CULTIVADOS EN LABORATORIO

Tabla 4. Hongos aislados de biosólidos PTAR San Fernando y porcentaje de reducción de Cr^{6+} .

Aislado	$[\text{Cr}^{6+}]_{\text{Inicial}}$ ppm	$[\text{Cr}^{6+}]_{\text{final}}$ ppm	% reducción Cr^{6+}
4002	763.48	621.80	18.56
4003	753.81	625.08	17.08
5001	633.8	509.77	19.57
5002	734.50	608.08	17.21
5003	643.89	555.42	13.74
5005	676.55	559.73	17.27
6001	986.46	915.84	7.16
6003	811.21	896.77	-10.55
6004	661.10	545.63	17.47
6005	998.06	849.16	14.92
6006	993.03	899.04	9.47
8001	617.63	542.91	12.10
8002	702.42	575.10	18.13
N.Ctrl	665.64	585.18	12.09
Cacao 1	650.91	568.50	12.66
Cacao 2	661.99	512.60	26.27
Amb 7	786.97	629.85	14.78
Amb 2	659.43	592.62	10.13
Amb 3	701.20	629.85	10.18


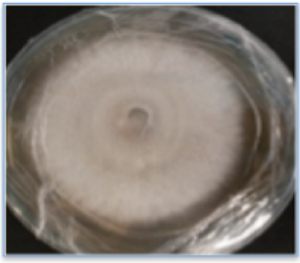
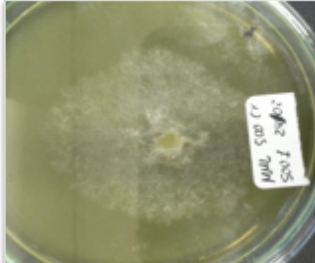
8001	8002	5001
		
<ul style="list-style-type: none"> • 1000 ppm Cr⁶⁺. • 12-11-2015. • Papa-Dextrosa-Agar • Dimorfismo con y sin cromo. • Crecimiento sin problema aparente 	<ul style="list-style-type: none"> • 1000 ppm Cr⁶⁺. • 12-11-2015. • Papa-Dextrosa-Agar • Dimorfismo con y sin cromo. • Crecimiento sin problema aparente 	<ul style="list-style-type: none"> • 500ppm Cr⁶⁺. • 24-02-2016. • Medio Mínimo de Lee • Dimorfismo con y sin cromo. • Crecimiento sin problema aparente

Ilustración 9. Morfología de los hongos con mayor potencial para remover Cr⁶⁺ (1)

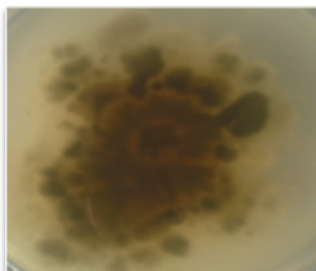


8001	8002	5001
		
<ul style="list-style-type: none"> • 0 ppm Cr⁶⁺. • 12-11-2015. • Papa-Dextrosa-Agar • Dimorfismo con y sin cromo. • Crecimiento sin problema aparente 	<ul style="list-style-type: none"> • 0 ppm Cr⁶⁺. • 12-11-2015. • Papa-Dextrosa-Agar • Dimorfismo con y sin cromo. • Crecimiento sin problema aparente 	<ul style="list-style-type: none"> • 0 ppm Cr⁶⁺. • 24-02-2016. • Medio Mínimo de Lee • Dimorfismo con y sin cromo. • Crecimiento sin problema aparente

Ilustración 10. Morfología hongos con mayor potencial para remover Cr⁶⁺ creciendo en ausencia del metal (1).

La caracterización morfológica de los aislados fúngicos, mostró que se presentaba un dimorfismo en presencia de cromo y en ausencia de él y que había variaciones observables a simple vista como la apariencia, el color, la forma, diámetro de la colonia y la textura. Al microscopio, pudo apreciarse también cambios en las esporas y estructuras reproductivas y en el crecimiento micelar. No obstante, no se profundizó en estas diferencias ya que escapaban a los objetivos de esta investigación.

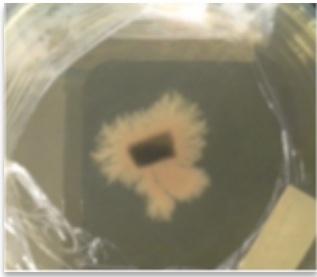
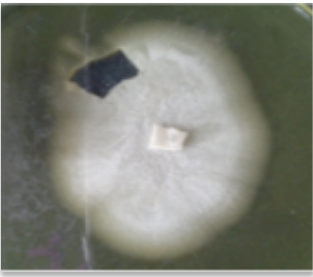
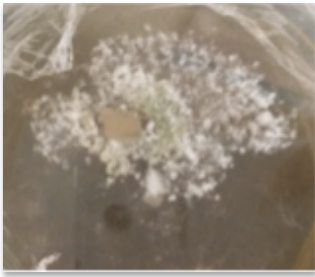
5004	Paecilomyces nc	6004
		
<ul style="list-style-type: none"> • 600 ppm Cr⁶⁺. • 19-02-2015. • Papa-Dextrosa-Agar • Dimorfismo con y sin cromo. • Buen crecimiento en 200 ppm Cr 	<ul style="list-style-type: none"> • 400 ppm Cr⁶⁺. • 19-02-2015. • Papa-Dextrosa-Agar • Dimorfismo con y sin cromo. • Buen crecimiento en 200 ppm Cr 	<ul style="list-style-type: none"> • 800 ppm Cr⁶⁺. • 27-11-2015. • Papa-Dextrosa-Agar • Dimorfismo con y sin cromo. • Muy buen crecimiento en 400 ppm Cr

Ilustración 11. Morfología de los hongos con mayor potencial para remover Cr⁶⁺ (2).

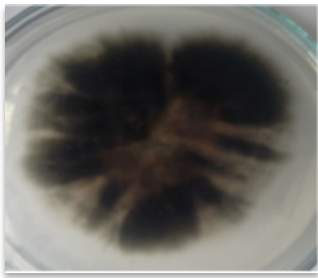
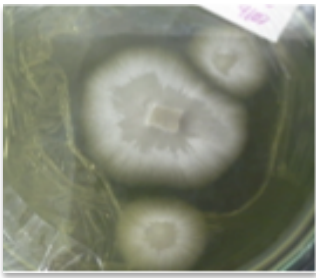
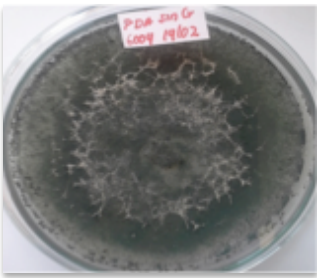
5004	Paecilomyces nc	6004
		
<ul style="list-style-type: none"> • 0 ppm Cr⁶⁺ • 19-02-2015. • Papa-Dextrosa-Agar • Dimorfismo con y sin cromo. • Buen crecimiento en 200 ppm Cr 	<ul style="list-style-type: none"> • 0 ppm Cr⁶⁺. • 19-02-2015. • Papa-Dextrosa-Agar • Dimorfismo con y sin cromo. • Buen crecimiento en 200 ppm Cr 	<ul style="list-style-type: none"> • 0 ppm Cr⁶⁺. • 27-11-2015. • Papa-Dextrosa-Agar • Crece muy diferente en medio sincromo. • Muy buen crecimiento en 400 ppm Cr

Ilustración 12. Morfología hongos con mayor potencial para remover Cr⁶⁺ creciendo en ausencia del metal (2).

• RESUMEN DE BACTERIAS AISLADAS EN LABORATORIO

Tabla 5. Bacterias aisladas de biosólidos PTAR San Fernando y % de reducción de Cr^{6+} .

Aislado	CMI [Cr] ppm	[Cr^{6+}]inicial ppm	[Cr^{6+}]final ppm	% Reducción
4003	200	103.03	58.73	42.99
4008.1	250+	107.19	54.7	49.01
4010	250+	101.99	58.73	42.41
4013	200	99.38	37.50	62.26
4031.1	250+	118.86	59.73	49.86
4016.1	250+	114.61	59.44	48.14
4024.1	250+	97.25	45.30	53.41
4025.3	250+	110.87	52.16	52.95
4028.2	250+	98.98	42.94	56.62
4031.3	250+	99.34	44.53	55.18
6008.1	250+	113.42	60.72	46.47
AcA	150	100.80	78.33	22.65
AcB	200	113.82	61.49	45.97
AcC	200	108.49	74.97	30.90
AcF	200	110.33	68.13	38.25
AcG	200	107.58	71.62	33.43
Ac7	200	112.64	74.35	34.00
AcD	200	109.43	46.06	57.91
AcE	200	108.93	70.65	35.15

Donde CMI= Concentración máxima inhibitoria

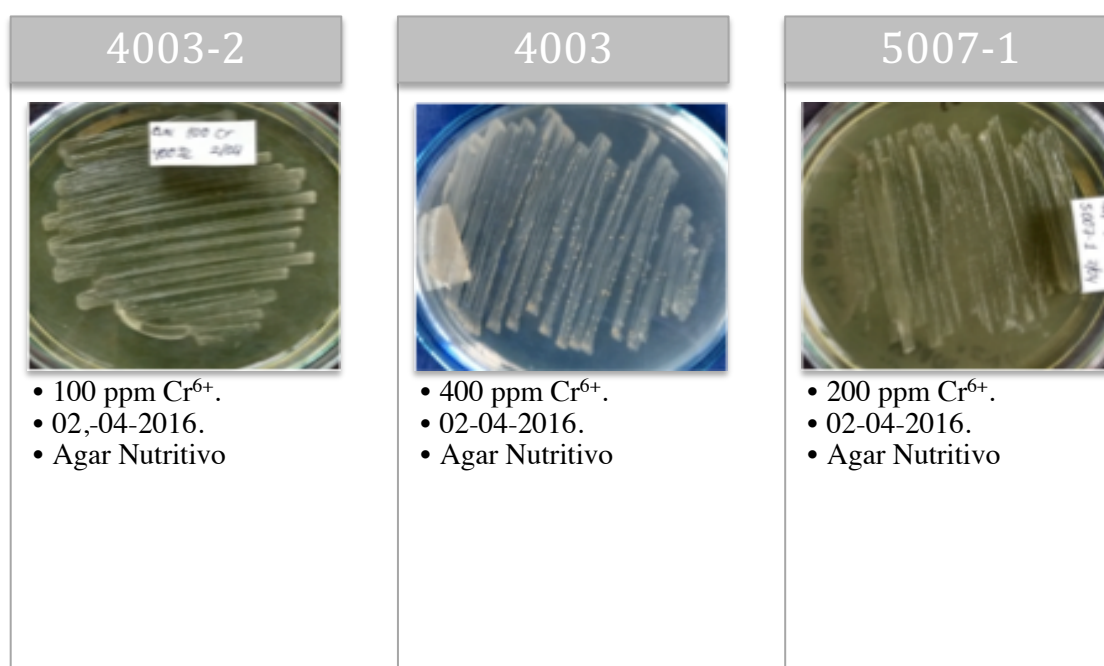


Ilustración 13. Bacterias con potencial para remover Cr^{6+} aisladas de biosólidos PTAR San Fernando.

- SECUENCIACIÓN MOLECULAR

Identificación de hongos por amplificación, secuenciamiento y análisis filogenético

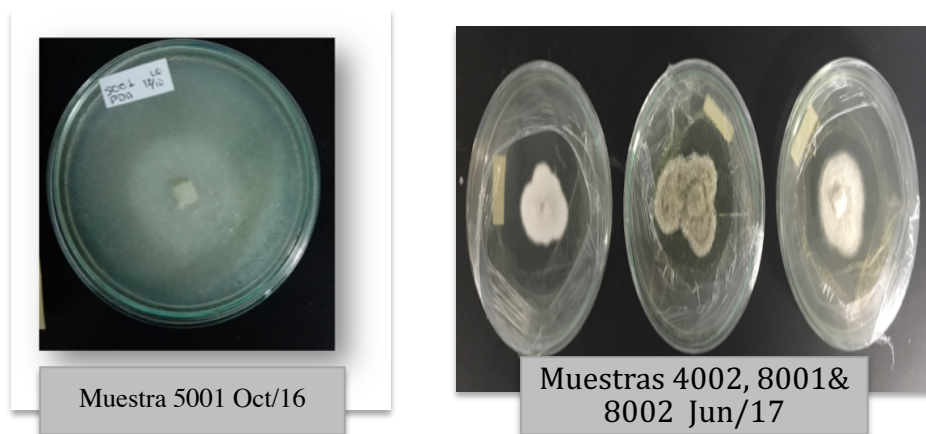


Ilustración 14. Muestras de hongos para secuenciamiento.

Tabla 6. Concentración del DNA muestra 5001.

Muestra	Concentración	Volumen
5001_UNAL	1,2 ng/ μ L	50 μ L

Amplificación muestra 5001

En la PCR se utilizaron los oligos ITS1: 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' e ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' que amplifican un fragmento alrededor de las 600 bases pb.

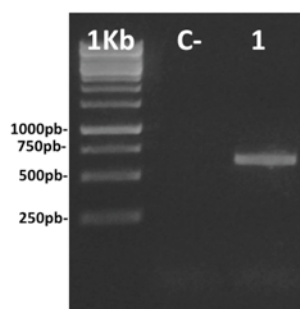


Ilustración 15. Resultado de la PCR muestra 5001.

Secuenciamiento muestra 5001

La muestra se sometió a reacción de secuenciamiento por el método de Sanger/capilar y leyendo ambas cadenas para asegurar la fiabilidad de la secuenciación.

Ensamblaje y clasificación muestra 5001

Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas mediante los programas Cap3 y eBioX versión 1.5.1. La secuencia final fue comparada a través de la herramienta de clasificación BLASTN y la base de datos de nucleótidos del NCBI para identificar secuencias putativamente homólogas en esta base de datos. Se obtuvo el siguiente resultado de *BEST HIT*:

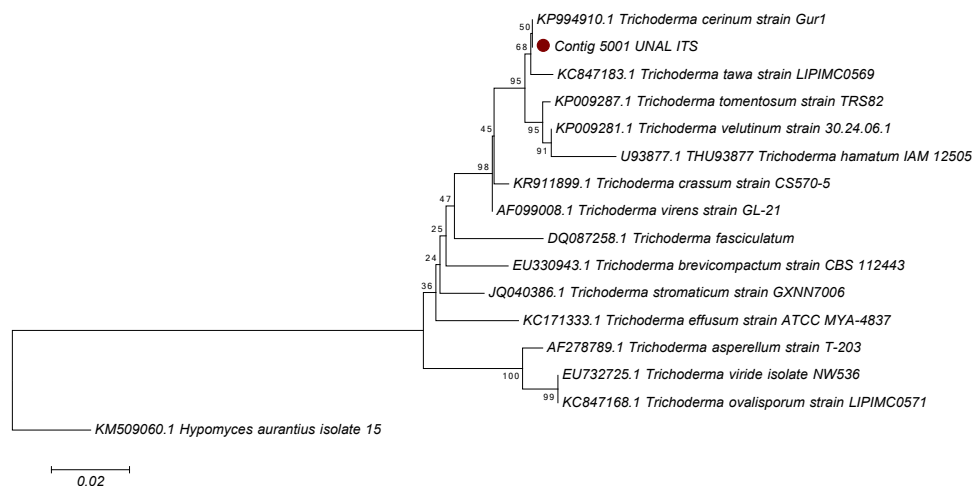
Tabla 7. Clasificación muestra 5001 mejor resultado.

Muestra	Best Hit	E-value	Query cover	Porcentaje de identidad
5001_UNAL	<i>Trichoderma</i> sp. 14 PV-2016 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	100%	100%

Análisis filogenético muestra 5001

Se llevó a cabo un análisis filogenético complementario que permitiera acercarse con mayor precisión al grupo al que pertenece. Teniendo en cuenta los resultados del BLASTN, se realizó la búsqueda de las secuencias de la región ITS1-ITS2 en las bases de datos, para esto se tuvieron en cuenta especies del género reportado en la tabla anterior.

Tabla 8. Muestra 5001 Análisis Filogenético.



Resumen final muestra 5001

- Con base en el espectro de absorción obtenido en la cuantificación por Nanodrop se amplificó exitosamente el fragmento de DNA de 600 pb aproximadamente usando los oligos para el ITS1/2.
- El amplicon de la región ITS1/2 obtenido a partir del aislado fue sometido al procedimiento de secuenciamiento capilar por ambas cadenas usando el método Sanger/capilar. Se obtuvieron cromatogramas aceptables.
- Según la herramienta BLASTN se detectaron secuencias putativamente homologas al género *Trichoderma*, que fueron usadas como referencia para el posterior análisis filogenético.
- En la matriz de distancia con el análisis del ITS se observó que la muestra 5001 era cercana a *Trichoderma cerinum*, con matriz de distancia de 0,000 y en el árbol filogenético se agrupó con las mismas secuencias con un bootstrap de 50.

Clasificación final muestra 5001

- Los resultados obtenidos soportan que la muestra 5001 corresponde al género ***Trichoderma***. Este marcador no da resolución para especie en este organismo.

Identificación por amplificación, secuenciamiento y análisis filogenético muestras 4002, 8001 y 8002.**Tabla 9.** Concentración del DNA muestras 4002, 8001 y 8002.

Muestra	Concentración	Volumen
4002_UNAL	4 ng/ μ L	50 μ L
8001_UNAL	12,7 ng/ μ L	50 μ L
8002_UNAL	5 ng/ μ L	50 μ L

Amplificación muestras 4002, 8001 y 8002

En la PCR se utilizaron los oligos ITS1: 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' e ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' que amplifican un fragmento alrededor de las 500 bases pb.

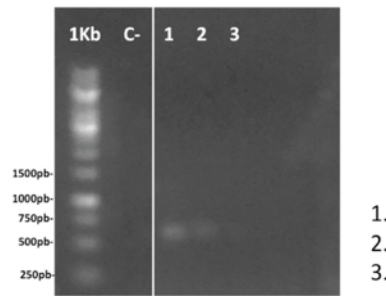


Ilustración 16. Resultado de la PCR muestras [1] 4002, [2] 8001, [3] 8002.

Secuenciamiento de muestras 4002, 8001 y 8002

Las muestras se sometieron a reacción de secuenciamiento por el método de Sanger/capilar, leyendo ambas cadenas para asegurar la fiabilidad de la secuenciación.

La muestra 8001, después de realizar y repetir el procedimiento de extracción y de secuenciamiento, presentó picos dobles de fluorescencia en el cromatograma, lo cual no permitió continuar con su clasificación. Este comportamiento podría estar asociado a contaminación con otros hongos.



Ilustración 17. Cromatograma muestra 4002 . Eje X posición de cada base en la secuencia obtenida, eje Y calidad del secuenciamiento para cada base, la calidad promedio de las secuencias para la muestra 4002 fue de 47.2.

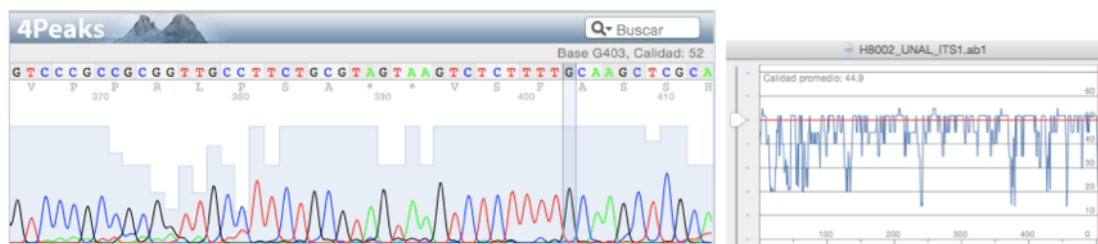


Ilustración 18. Cromatograma muestra 8002. Eje X posición de cada base en la secuencia obtenida, eje Y calidad del secuenciamiento para cada base, la calidad promedio de las secuencias para la muestra 8002 fue de 44.9

Ensamblaje y clasificación muestras 4002 y 8002

Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas mediante los programas Cap3 y eBioX versión 1.5.1. La secuencia final fue comparada a través de la herramienta de clasificación BLASTN y la base de datos de nucleótidos del NCBI para identificar secuencias putativamente homólogas en esta base de datos. Se obtuvo el siguiente resultado de *BEST HIT*:

Tabla 10. Clasificación de las muestras 4002 y 8002, mejor resultado.

Muestra	Best Hit	E-value	Query cover	Porcentaje de identidad
4002_UNAL	<i>Scedosporium dehoogii</i> isolate F38-03 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	100%	99%
8002_UNAL	<i>Scedosporium boydii</i> culture MUT:3075 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	100%	99%

Análisis filogenético muestras 4002 y 8002

Se llevó a cabo un análisis filogenético complementario que permitiera acercarse más al grupo al que pertenece. Teniendo en cuenta los resultados del BLASTN, se realizó la búsqueda de las secuencias de la región ITS1-ITS4 en las bases de datos, para esto se consideraron secuencias reportadas por Lackner y colaboradores (Lackner et al., 2012)

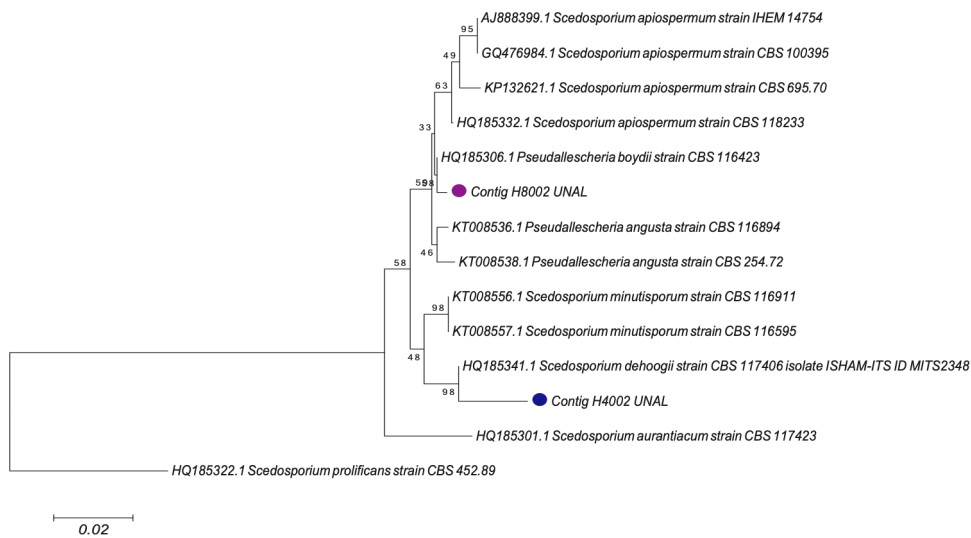
Tabla 11. Muestras 4002 y 8002 Análisis Filogenético.

Tabla 12. Matriz de distancia muestras 4002 y 8002.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. KT008536.1 <i>Pseudallescheria angusta</i> strain CBS 116894		0.004	0.006	0.005	0.006	0.007	0.003	0.006	0.006	0.009	0.007	0.024	0.010	0.004
2. KT008538.1 <i>Pseudallescheria angusta</i> strain CBS 254.72	0.007		0.006	0.005	0.006	0.007	0.004	0.006	0.006	0.010	0.008	0.024	0.010	0.005
3. A388399.1 <i>Scedosporium apiospermum</i> strain JHEM 14754	0.017	0.015		0.004	0.000	0.005	0.005	0.008	0.008	0.011	0.009	0.024	0.011	0.006
4. HQ185332.1 <i>Scedosporium apiospermum</i> strain CBS 118233	0.010	0.012	0.007		0.004	0.004	0.003	0.007	0.007	0.010	0.007	0.023	0.010	0.004
5. GQ476984.1 <i>Scedosporium apiospermum</i> strain CBS 100395	0.017	0.015	0.000	0.007		0.005	0.005	0.008	0.008	0.011	0.009	0.024	0.011	0.006
6. KP132621.1 <i>Scedosporium apiospermum</i> strain CBS 695.70	0.017	0.020	0.010	0.007	0.010		0.005	0.009	0.009	0.011	0.009	0.023	0.011	0.006
7. HQ185306.1 <i>Pseudallescheria boydii</i> strain CBS 116423	0.005	0.007	0.012	0.005	0.012	0.012		0.006	0.006	0.009	0.006	0.023	0.009	0.002
8. KT008556.1 <i>Scedosporium minutisporum</i> strain CBS 116911	0.017	0.015	0.025	0.022	0.025	0.030	0.017		0.000	0.009	0.006	0.024	0.009	0.007
9. KT008557.1 <i>Scedosporium minutisporum</i> strain CBS 116595	0.017	0.015	0.025	0.022	0.025	0.030	0.017	0.000		0.009	0.006	0.024	0.009	0.007
10. HQ185301.1 <i>Scedosporium aurantiacum</i> strain CBS 117423	0.035	0.038	0.049	0.041	0.049	0.049	0.035	0.035	0.035		0.009	0.023	0.012	0.009
11. HQ185341.1 <i>Scedosporium dehoogii</i> strain CBS 117406 isolate ISHAM-ITS ID MITS2348	0.022	0.025	0.030	0.022	0.030	0.030	0.017	0.015	0.015	0.035		0.023	0.006	0.007
12. HQ185322.1 <i>Scedosporium prolificans</i> strain CBS 452.89	0.157	0.157	0.153	0.149	0.153	0.146	0.149	0.160	0.160	0.157	0.153		0.025	0.023
13. Contig H4002 UNAL	0.040	0.043	0.048	0.040	0.048	0.048	0.035	0.032	0.032	0.053	0.017	0.170		0.010
14. Contig H8002 UNAL	0.007	0.010	0.015	0.007	0.015	0.015	0.002	0.019	0.019	0.038	0.020	0.153	0.037	

Resumen final muestras 4002 y 8002

- Basados en el espectro de absorción obtenido en la cuantificación por Nanodrop, se amplificó exitosamente el fragmento de DNA de 500 pb aproximadamente de la muestra usando los oligos para el ITS1/4.
- El amplicon de la región ITS1/4 obtenido a partir del aislado fue sometido al procedimiento de secuenciación capilar por ambas cadenas usando el método Sanger/capilar. Se obtuvieron cromatogramas aceptables para las muestras 4002 y 8002.
- Según la herramienta BLASTN para las muestras 4002 y 8002, se detectaron secuencias putativamente homologas a los géneros *Scedosporium* y *Pseudallescheria*; los cuales se usaron como referencia para el posterior análisis filogenético.
- En la matriz de distancia con el análisis del ITS se observó que la muestra 4002 era cercana a *Scedosporium dehoogii* , con una matriz de distancia de 0,017 y en el árbol filogenético se agrupó con las mismas secuencias con un bootstrap de 98.
- En la matriz de distancia con el análisis del ITS se observó que la muestra 8002 era cercana a *Pseudallescheria boydii* , con una matriz de distancia de 0,002 y en el árbol filogenético se agrupó con las mismas secuencias con un bootstrap de 58.

Clasificación final muestras 4002 y 8002

- Los resultados obtenidos soportan que los organismos 4002 y 8002 son del género ***Pseudallescheria*** cuyo estado anamorfo es el genero ***Scedosporium*** .

- IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS MEDIANTE EL PROTOCOLO API

La identificación de algunos de los principales géneros bacteriales con potencial para remover cromo fue llevada a cabo mediante caracterización bioquímica recurriendo al protocolo API.

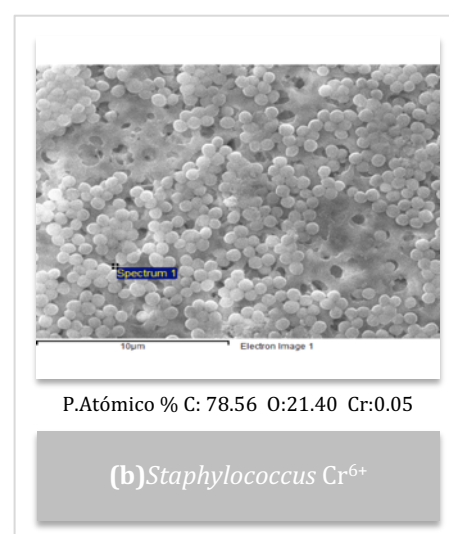
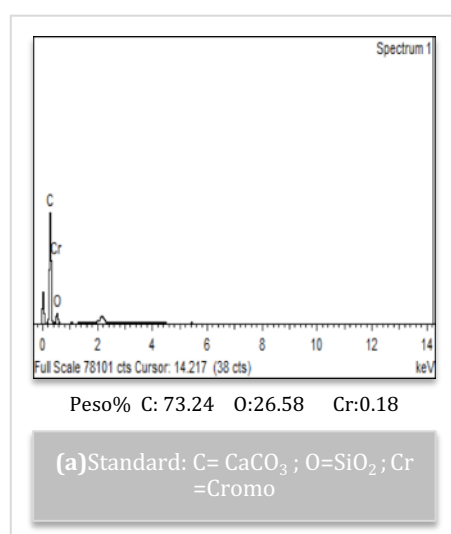
Tabla 13. Detalle de los principales géneros bacteriales caracterizados bioquímicamente mediante el protocolo API método 50CHB V4.

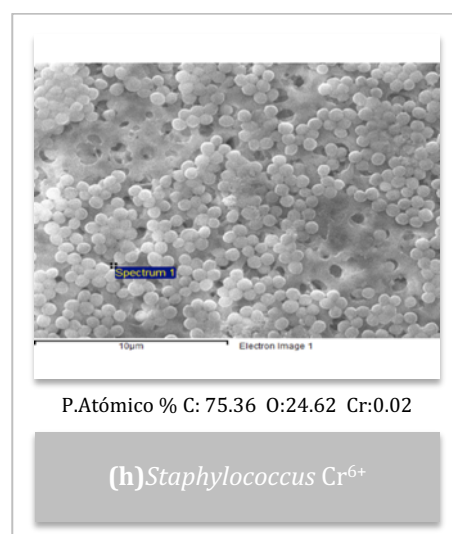
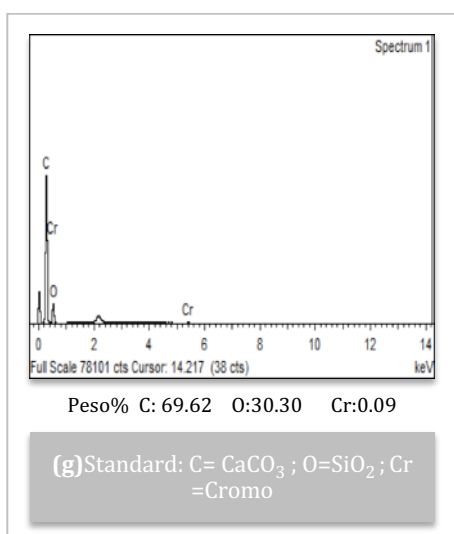
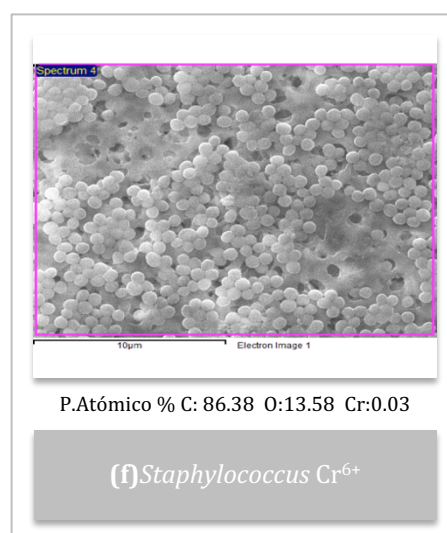
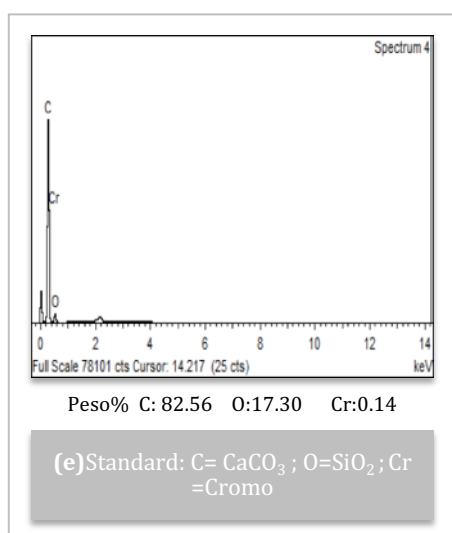
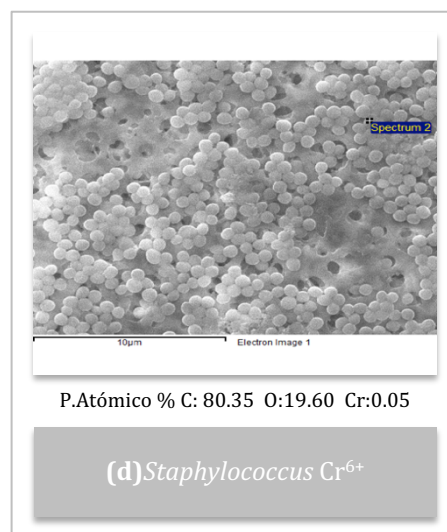
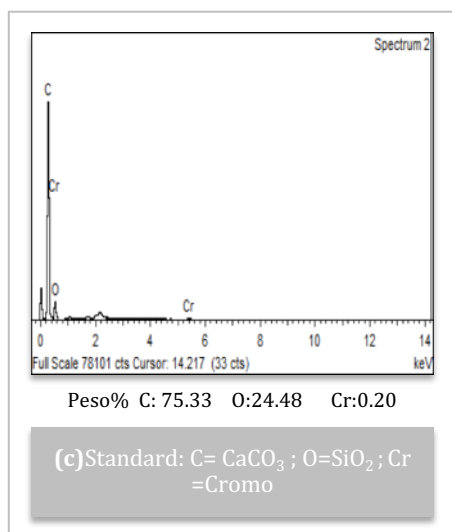
Código	Método Identificación	Cepa	% ID
AcA	API 50CHB V4	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	95.7
AcB	API 50CHB V4	<i>Bacillus cereus/ thuringiensis</i>	51.1
AcC	API 50CHB V4	<i>Bacillus megaterium</i>	96.0
AcD	API 50CHB V4	<i>Bacillus cereus/ thuringiensis</i>	60.4
AcE	API 50CHB V4	<i>Bacillus firmus</i>	88.6
AcF	API 50CHB V4	<i>Bacillus lentus</i>	97.3
AcG	API 50CHB V4	<i>Bacillus cereus</i>	95.1

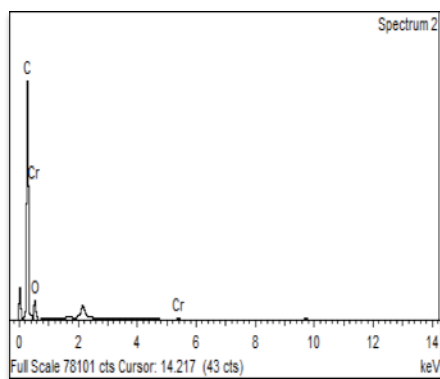
Son notables los reportes en los últimos años de especies pertenecientes al genero *Bacillus* en el campo de la bioremediación, no solamente con cromo sino con varios metales, metaloides y otros contaminantes; sin embargo resulta revelador en este experimento la diversidad específica encontrada, pues son frecuentes los reportes correspondientes a *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium* y *B. cereus*, pero pocos hallazgos dan cuenta de *B. thuringiensis*, *B. firmus* y *B. lentus*.

- DETERMINACIÓN DE CROMO POR MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.

Algunas aislados bacteriales fueron preseleccionadas de ensayos precedentes por su habilidad para crecer en medios enriquecidos con cromo y su capacidad para reducir Cr^{6+} a Cr^{3+} . Las pruebas fueron corridas para *Staphylococcus saprophyticus* y *Bacillus subtilis* y se evaluó presencia de alguna de las especies (Cr^{6+} y Cr^{3+}) al interior del citoplasma, para ello se recurrió al microscopio electrónico de barrido (SEM).

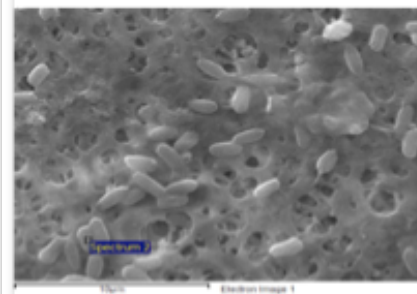






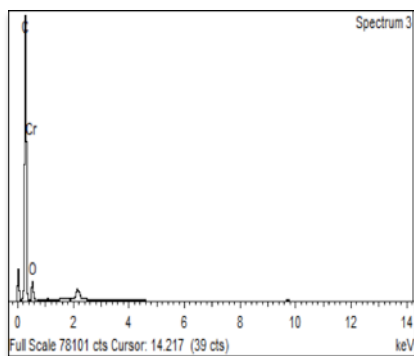
Peso% C: 75.34 O:24.54 Cr:0.12

(i) Standard: C= CaCO_3 ; O= SiO_2 ; Cr=Cromo



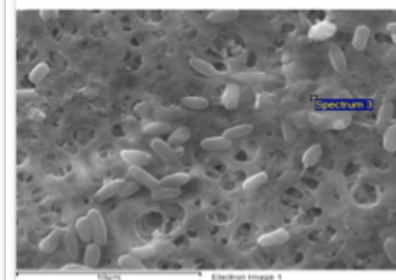
P.Atómico % C: 80.33 O:19.64 Cr:0.03

(j) *Bacillus Cr⁶⁺*



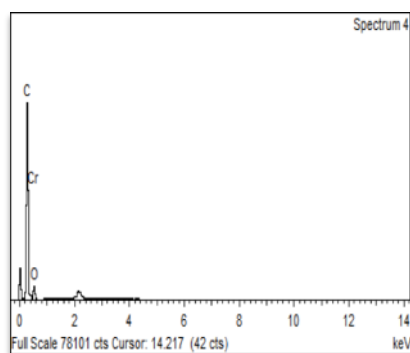
Peso% C: 78.46 O:21.49 Cr:0.04

(k) Standard: C= CaCO_3 ; O= SiO_2 ; Cr=Cromo



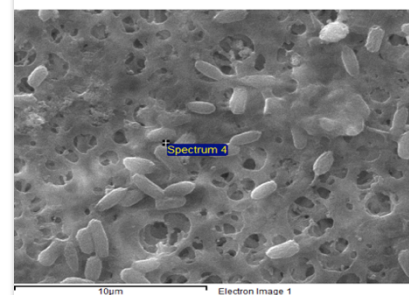
P.Atómico % C: 82.93 O:17.06 Cr:0.01

(l) *Bacillus Cr⁶⁺*



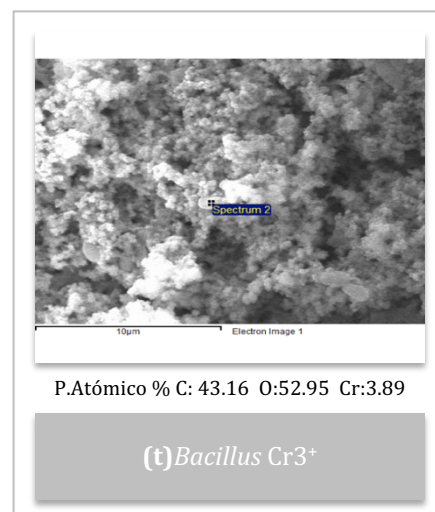
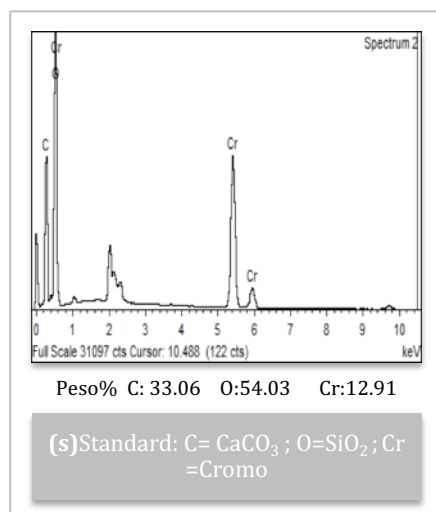
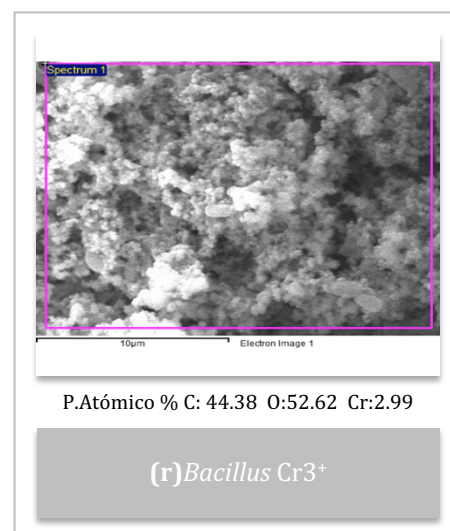
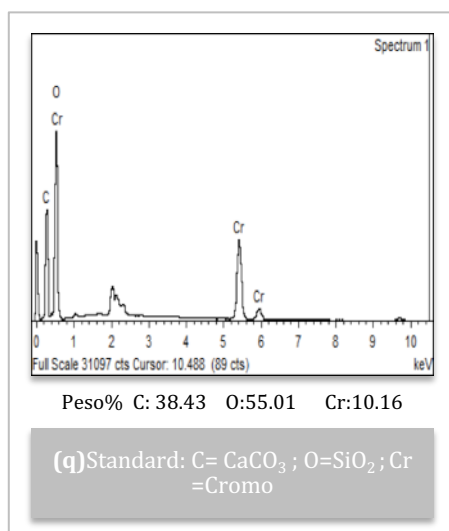
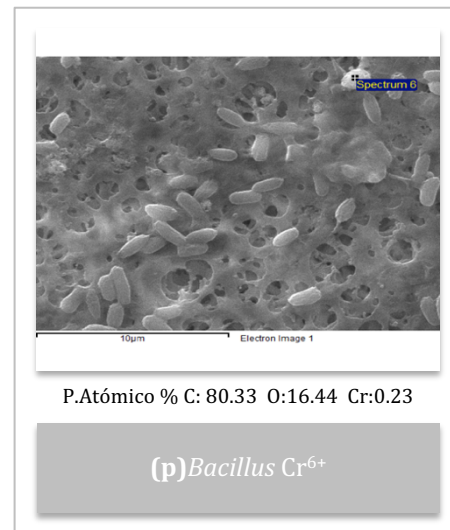
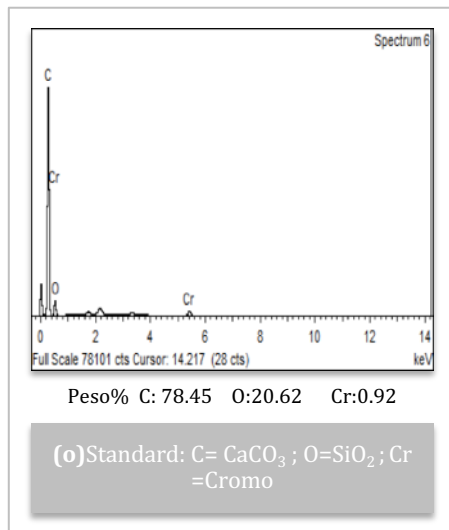
Peso% C: 77.46 O:22.44 Cr:0.11

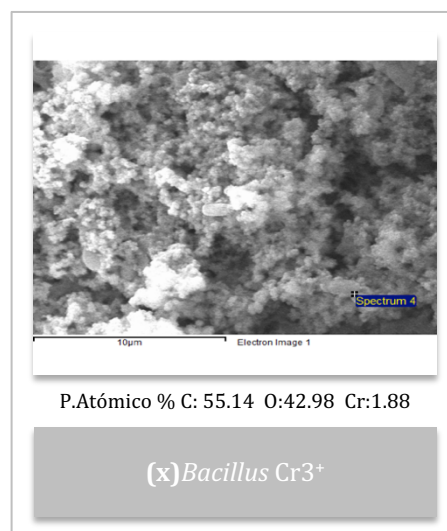
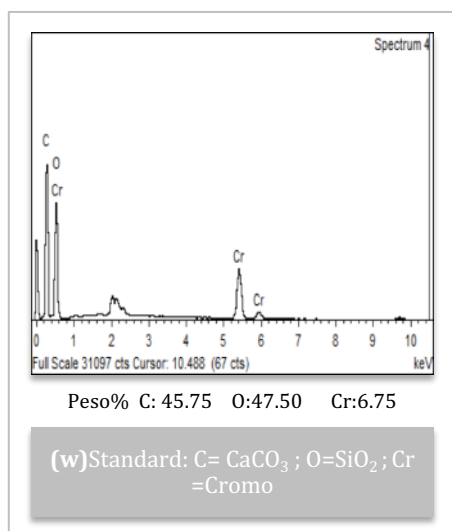
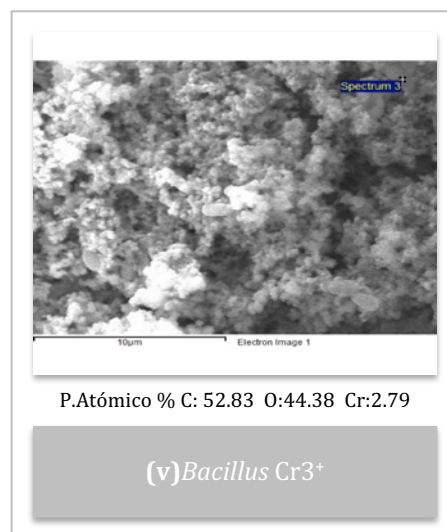
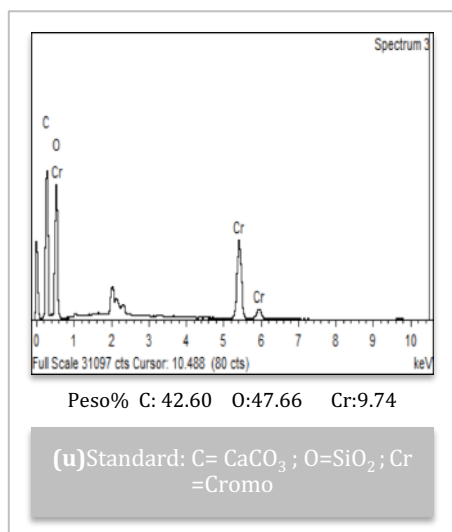
(m) Standard: C= CaCO_3 ; O= SiO_2 ; Cr=Cromo



P.Atómico % C: 82.12 O:17.86 Cr:0.03

(n) *Bacillus Cr⁶⁺*





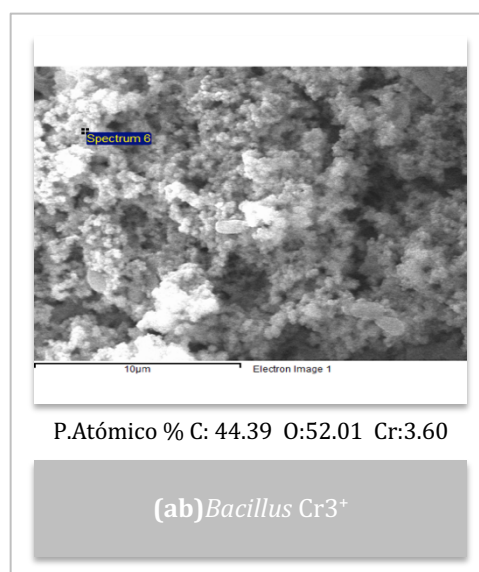
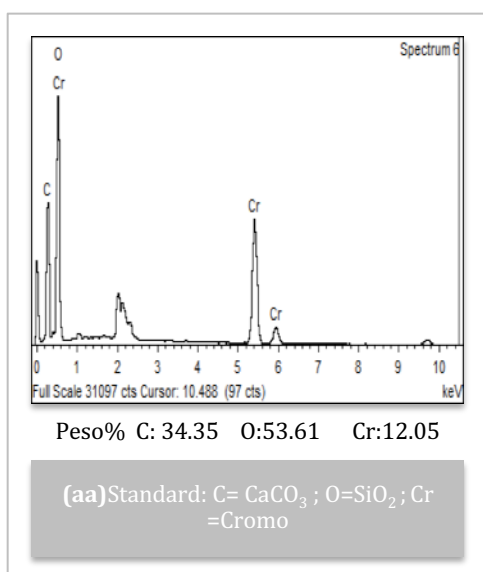
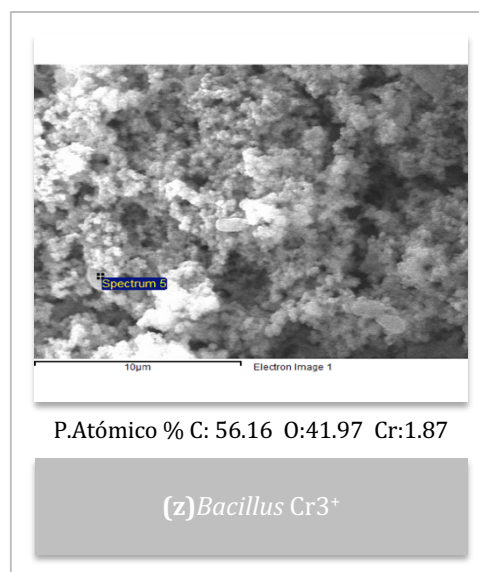
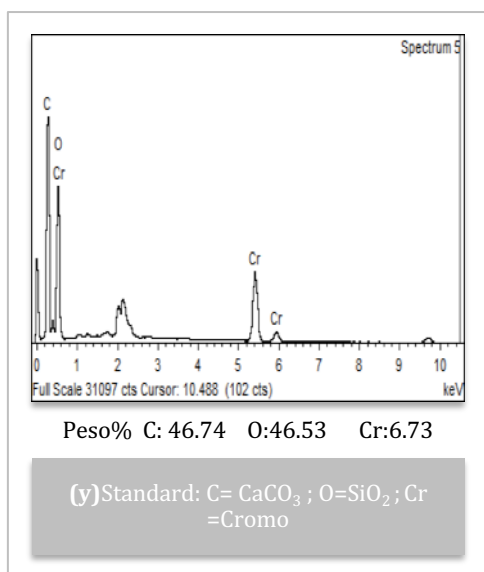


Ilustración 19. Pruebas al microscopio electrónico de barrido para observar la presencia de Cr^{6+} y Cr^{3+} en *Staphylococcus* y *Bacillus*. Imágenes **a** hasta **n** con contenidos de cromo por debajo del 0,2 % del peso de la muestra, requerido para detección del equipo. Imágenes **o** hasta **ab**, con contenidos de cromo superiores al 0.2 % del peso total de la muestra.

2.2.6 DISCUSIÓN

2.2.6.1. Resumen de los organismos caracterizados

La Tabla 14. resume la selección de microorganismos caracterizados e identificados por diferentes métodos, destacados por su capacidad para remover cromo, a partir de los cuales se hará la selección para evaluar algunos de ellos en invernadero.

Prácticamente todos los géneros fúngicos y bacteriales caracterizados han sido reportados por diferentes autores removiendo cromo en diferentes concentraciones, condiciones y medios de

cultivo. *Ochrobactrum intermedium*, se aisló de suelo contaminado con cromo y redujo 100 mg L⁻¹ de Cr⁶⁺ en 52 h con una tasa de reducción de 1.98 mg L⁻¹ h⁻¹; la tasa de reducción disminuyó cuando se incrementó la concentración de 100 a 500 mg L⁻¹ (Kavita & Keharia, 2012).

Tabla 14. Hongos y bacterias caracterizados por diferentes métodos y porcentaje de remoción de cromo a la Concentración Mínima Inhibitoria.

Método de Caracterización	Código	Microorganismo	CMI(*) Cr ⁶⁺ ppm	% reducción Cr ⁶⁺
Secuenciación	5001	<i>Trichoderma sp</i>	650	19,57
Secuenciación	4002	<i>Scedosporium dehoogii</i>	750	18.56
Secuenciación	8002	<i>Scedosporium boydii</i>	750	18.13
Protocolo API	AcA	<i>Bacillus subtilis</i>	150	22.65
Protocolo API	AcB	<i>Bacillus cereus</i>	200	45.97
Protocolo API	AcC	<i>Bacillus megaterium</i>	200	30.90
Protocolo API	AcD	<i>Bacillus cereus</i>	200	57.91
Protocolo API	AcE	<i>Bacillus firmus</i>	200	35.15
Protocolo API	AcF	<i>Bacillus lentus</i>	200	38.25
Protocolo API	AcG	<i>Bacillus cereus</i>	200	33.43
Biolog M.Station	PI020	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1400	12.09
Biolog M.Station	Amb7	<i>Fusarium verticillioides</i>	1400	14.78
Biolog M.Station	6008.1	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	250	46.47
Biolog M.Station	6008	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	250	46.47
Biolog M.Station	4008.1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	250	49.01

(*) CMI= Concentración Mínima Inhibitoria

Tigini y otros, (2018) en aguas de curtiembres en 63 muestras, aislaron 100 especies de hongos con potencial de remediación, *Scedosporium* fue la especie con mayor potencial y reportan también a *Fusarium sp* y *Trichoderma sp*. (Tigini et al., 2018). En este estudio *Scedosporium* fue aislado como contaminante ambiental y aunque en el ensayo de reducción presenta uno de los porcentajes más bajos de todos los materiales analizados (18.13), la respuesta del hongo al aumentar la concentración de cromo buscando la CMI, fue sobresaliente.

El género *Bacillus* resulta ser uno de los más mencionados en investigaciones realizadas con aguas residuales de curtiembres (Verge, Stiles, Chong, & Terry, 2012, Cheng et al., 2010, T. Verma, Garg, & Ramteke, 2009, Sandana Mala, Sujatha, & Rose, 2015), lo cual coincide con lo encontrado aquí, con siete de las muestras caracterizadas por el protocolo API reportadas con el género *Bacillus*, no obstante tres de ellas correspondieron a la especie *B. cereus*.

Aunque *Paecilomyces lilacinus*, ha sido destacado por muchos autores que coinciden sobre su potencial para reducir cromo, la cepa evaluada en esta investigación no destacó por su capacidad de remoción (12.09 % de Cr⁶⁺). Son notables los trabajos llevados a cabo por investigadores de la Universidad de San Luis de Potosí donde reportan reducción del 100 % de Cr⁶⁺ por la acción de *P. lilacinus* (Cárdenas-González et al., 2011).

Staphylococcus saprophyticus subs. bovis, fue evaluado en Bangalore, India y toleró dosis hasta de 3000 mg k⁻¹ de Cr⁶⁺ con remoción del 2 % a las 24 horas (Alekhya Iyengar & Subbaiah Usha, 2016).

2.2.6.2. Análisis al microscopio electrónico de barrido

El análisis SEM permite diferenciar bien la contrastante morfología del coco esférico (0,05 μm) y el bacilo oblongo (2,5 μm) sobre la malla de nitrocelulosa en la que ambas muestras fueron filtradas. A pesar de la imagen en varios planos que ofrecen las imágenes SEM, el tamaño de los géneros *Staphylococcus* y *Bacillus* no ofrece en este caso una resolución que permita determinar si el cromo está al interior del citoplasma o adsorbido a la membrana celular. No obstante, algunos

imágenes como la que se observa en la ilustración 19 **k**-Spectrum 3, detallan una región, en la que no se aprecia de manera definida la membrana de los bacilos, permitiendo pensar que hay ruptura de la misma con vaciamiento del contenido citoplasmático. En otros Spectrum como en 19 **d**-2 para el caso del coco, se aprecia una aglomeración bacteriana en una de las pocas regiones del mapa con presencia de cromo (ver anexo B-2) que permitiría pensar que formas reducidas de cromo están adsorbidas a la membrana celular.

Las imágenes referentes a los Spectrum se concentran en alguna región del mapa que es sugerida por el color específico que refleja cada elemento (anexo B-2), cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de dicho elemento en la muestra. Los Spectrum reportados en el informe corresponden a regiones del mapa que se auscultan en profundidad en un radio de 5 μm y se determinan por la concentración del color que refleja el mapa general, resaltado en el marco exterior con el color lila.

Por su parte el análisis micro-elemental (EDS) no permite determinar el estado de oxidación del elemento de interés y sólo el conocimiento previo de la especie al momento de preparar la muestra (como en este caso), permitiría hacer inferencias mediante observaciones contrastantes. Los resultados se consignan en los mapas espectrales micro-elementales (anexo B-2). Para conseguir una resolución mínima y desarrollo del color, el equipo requiere un peso del elemento de al menos 0.2 % del peso de la muestra. Detállese los mapas de los diferentes espectros desde **a**-hasta **n**, que sólo reportan trazas de cromo que no superan este porcentaje. Al observar los mapas (anexo 2) el color azul reflejado por el cromo, para la secuencia mencionada, apenas si se insinúa, evidenciando las bajas cantidades del elemento para las muestras que crecieron en medios con Cr^{6+} .

En las imágenes espectrográficas pueden apreciarse dos picos para el cromo en momentos diferentes, estos corresponden a dos intensidades de energía del cromo en las capas $K\alpha$ y $L\alpha$ de su estructura orbital, mas no a dos estados de oxidación, como sería el caso de las formas trivalente y hexavalente.

Algunos investigadores (R. Singh et al., 2016) han sugerido el análisis SEM-EDS como una técnica que permite concluir sobre el contenido de determinado elemento en una muestra, pero si el elemento tiene diferentes estados de oxidación y las condiciones redox revelan alta inestabilidad del elemento, esta técnica se queda corta y no permite concluir para análisis de especiación. Es posible que técnicas como la tomografía computacional que permite imágenes de cortes transversales de la muestra, o la técnica de microscopía electrónica XPS, que puede definir con mayor precisión aspectos de tipo químico del elemento a una profundidad hasta de 10 nm, podrían ser suficientes.

Sin embargo, R. Singh et al., (2016) utilizaron pruebas SEM para identificar cambios morfológicos de *Metanothermobacter thermoautotrophicus* expuesto a 5 dosis de Cr^{6+} y para identificar la fase mineral reducida del metal por la acción bacteriana.

Bharagava & Mishra, (2018) caracterizaron mediante la secuencia del gen 16S rRNA la bacteria *Cellulosimicrobium* sp que mostró reducciones del 97 y 99 % de Cr^{6+} a 50 y 100 mg L^{-1} respectivamente y en 200 y 300 mg L^{-1} removió 85 y 62 % después de 96 h. El análisis SEM reveló que las células expuestas a Cr^{6+} mostraron un mayor tamaño frente a células no expuestas y concluyen los investigadores que esto podría deberse a la adsorción a la membrana celular del Cr^{3+} reducido. El análisis de rayos x dispersivo, EDX, mostró algunos picos para las células expuestas a Cr^{6+} y consideran los autores que podría ser debido a que el Cr^{3+} reducido se acompleja a la membrana celular. Lo anterior sería muy similar a lo encontrado en éste estudio.

Un aspecto que preocupa y deberá confirmarse, es saber si los resultados conseguidos en el laboratorio, serán reproducibles y escalables cuando los organismos sean de vida libre. Factores como el medio y tiempo de cultivo, la habilidad para crecer como facultativo u obligado, la oferta ambiental idónea para reproducirse, la capacidad de resiliencia frente a otros contaminantes del medio y la rusticidad para crecer en condiciones adversas o extremas, son elementos que deben ser considerados a la hora de otorgar a alguna especie la posibilidad de ser evaluada como remediadora. Por ejemplo, *M. thermoautotrophicus*, es un microorganismo metanogénico, termofílico y obligado, que crece bien a temperaturas cercanas a los 70 °C y a logrado reducciones del cromo hexavalente del 100 % en concentraciones de 0,2 mM (R. Singh et al., 2016).

Diferentes investigadores coinciden al afirmar que el pH, el contenido de materia orgánica, la presión parcial de oxígeno y el potencial redox, son los elementos más significativos a tener en cuenta en la oxidación o reducción de cromo (Apte et al., 2005) y afirman también que las condiciones que favorecen la oxidación, favorecerían también la reducción (Brose & James, 2008).

Lo anterior presupone asumir que la estabilidad de las especies de cromo son iguales. Los ensayos conducidos hasta este capítulo ponen de manifiesto la mayor inestabilidad de la forma hexavalente, o una cinética de reducción más alta que la de la oxidación, lo cual debe ser tenido en cuenta para evitar interferencias en la determinación, afectando los resultados y llevando a conclusiones erróneas.

La capacidad sinérgica o antagónica con otros organismos al momento de enfocarlos como consorcio para conformar una batería de remediación microbiana, deberá ser tomada en cuenta y no debe ser postergada. Investigadores trabajando en antiguas minas en Corea, demostraron que las bacterias que crecen en consorcio en diferentes matrices de contaminantes ambientales desarrollan una capacidad específica que normalmente supera su capacidad individual. Dos cepas de *Enterobacter cloacae* (kj-46 y 47), *Viridibacillus arenosi* y *Sporosarcina soli* creciendo en comunidad mejoraron su tasa de crecimiento, aumentaron la eficacia de la enzima ureasa y superaron su capacidad individual de resistencia a metales como el Pb, Cd y Cu (Kang, Kwon, & So, 2016).

De esta forma es posible que *Staphylococcus*, *Ochrobactrum*, las diferentes especies de *Bacillus* encontradas en estos ensayos y algunas otras que no fueron seleccionadas para pasar a la fase de secuenciación, pudieran llegar a crecer en un consorcio específico y mejorar su capacidad de remediación cuando lo hacen de manera sinérgica al interior de una comunidad bacteriana. Un modelo de consorcio será evaluado en el capítulo E de esta investigación.

2.2.7. CONCLUSIÓN

Allí donde se origina la contaminación de manera recurrente o donde existen fuentes de contaminantes permanentes, es altamente posible que diversos microorganismos co-evolucionen y desarrollen mecanismos de resiliencia, tolerancia y resistencia. Referente al cromo se reporta el hallazgo de 48 morfotipos en la fuente (PTAR y curtiembres), con diferentes grados de tolerancia y resistencia al metal, que los facultarían para ser utilizados en diversos procesos de bioestimulación y bioaumentación para remover cromo en ambientes contaminados.

2.3. Capítulo C

Capacidad biológica para bioremediar cromo hexavalente *in-situ*.

2.3.1. RESUMEN

El experimento anterior permitió determinar cuales microorganismos reportaron mejor habilidad para crecer en medios enriquecidos con cromo y cuales mostraron mejor capacidad reductora de Cr^{6+} a Cr^{3+} . Se seleccionaron *Ochrobactrum* sp y *Bacillus* sp. y dos especies de hongos, *Trichoderma* sp y *Paecilomyces lilacinus* para crear un consorcio microbial con potencial bioremediador. Macetas plásticas con capacidad de 2 kilogramos se llenaron con 2 tipos de suelos de mineralogía contrastante, implementadas con un dispositivo en geotextil para aislar el suelo rizosférico del no rizosférico, algunas de ellas enriquecidas con dicromato de potasio y biosólidos, en presencia de frijol arbustivo *Phaseolus vulgaris* e inoculadas algunas de ellas con el consorcio microbial señalado.

Se conformó así un modelo experimental mixto, incompleto y no homogéneo que fue corrido en el paquete estadístico SAS mediante una prueba de mínimos cuadrados. Las interacciones dobles de mayor relevancia mostraron diferencia estadística para un nivel de significancia inferior al 0.05. Se confirmó estadísticamente que dosis de cromo considerablemente altas, que alcanzan el doble de concentración mínima inhibitoria, favorecen la actividad microbial para remover Cr^{6+} .

2.3.2. ESTADO DEL ARTE

Los mecanismos de interacción del cromo con células fúngicas o microbiales incluyen: biotransformación directa e indirecta, inmovilización, biosorción, incorporación, cometabolismo y bioacumulación. Tales mecanismos son aún inciertos y se desconocen aspectos fundamentales de los procesos, que van desde la transformación química hasta la incorporación a las células o la formación de diferentes complejos (Gutiérrez Corona et al., 2010). En algunos casos intervienen interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, uniones covalentes, interacciones redox, precipitación extracelular o la combinación de varios de estos procesos (Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez, 2016).

En el caso de los hongos, las interacciones con el cromo más estudiadas han sido la biotransformación, enzimática o no, para reducir Cr^{6+} a Cr^{3+} , la biosorción y la inmovilización, caracterizadas por la unión pasiva del metal con componentes de la pared o la membrana celular y la bioacumulación, en la que ocurre la entrada del metal al interior de la célula con gasto de energía. Mediante mecanismos de homeostasis los hongos mantienen un balance entre la incorporación, expulsión y captura del metal (Gutiérrez Corona et al., 2010).

En la bioestimulación, en la que se activa la población microbiana nativa, se involucra la introducción artificial de poblaciones con capacidad remediadora; la bioacumulación en cambio puede emplear el uso células vivas o como en el caso de la biosorción, en la que se involucra biomasa microbiana muerta (Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez, 2016).

La bioacumulación es llevada a cabo con gasto de energía a través de la H^+ -ATPasa y una vez se incorpora el metal al citoplasma es secuestrado por proteínas ricas en grupos sulfidrílos conocidas como metalotioneinas (MT), fitoquelatinas (FQ) y algunos péptidos que logran unirse a los metales (Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez, 2016). Las metalotioneinas, son proteínas de bajo peso molecular (6-7 kDa) ricas en cisteína, que han sido aisladas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* y los géneros *Cyanobacterium* sp. y *Syneococcus* sp. y juegan un rol

fundamental en la interacción y transporte del metal, facilitando su absorción al interior del citoplasma (Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez, 2016).

Acinetobacter sp. resultó promisorio en estudios de co-remediación de compuestos fenólicos y Cr^{+6} . Ésta bacteria, al parecer tiene la facultad de utilizar el fenol como fuente de carbono y energía, pero cuando el medio en el que crece se enriquece con glucosa, desarrolla la habilidad de reducir cromo hexavalente adicionalmente (Bhattacharya et al., 2014).

Faisal & Hasnain, (2006) aislaron una cepa de *Bacillus cereus* S-6 y reportaron una capacidad alta de esta cepa para reducir Cr^{6+} aunque sólo trabajaron con concentraciones de 25 y 50 mg mL^{-1} ; reportan además que los metales pesados Ni, Mn, Zn, Cu y Co en bajas concentraciones, no afectaron la capacidad de reducción de la cepa.

La capacidad de remoción de metales por bacterias, microalgas y hongos es superior a la reportada con métodos fisicoquímicos convencionales (Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez, 2016), no obstante algunos procesos de bioremediación no suelen ser suficientes y es necesario recurrir a varias alternativas como la inmovilización química en el suelo por medio de acomplexantes.

Los biofiltros elaborados con microalgas y bacterias han sido usados para la descontaminación de Cr y Cd a partir de desechos de metales (Zeraatkar et al., 2016).

2.3.3. OBJETIVOS

- Confirmar si la capacidad reductora de Cr^{+6} demostrada por microorganismos cultivados en laboratorio se mantiene bajo invernadero, en presencia de suelos con mineralogías contrastantes y altas dosis de cromo en algunos tratamientos.
- Mediante pruebas de genómica evaluar la meta-diversidad bacteriana resultante en suelo rizosférico comparado con suelo no rizosférico en presencia de frijol arbustivo como bioindicador.

2.3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

• UBICACIÓN

La investigación se llevó a cabo en el Invernadero de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, Sede de Medellín: Latitud: $6^{\circ} 15' \text{ N}$; Longitud $75^{\circ} 35' \text{ W}$; Altitud: 1495 m; Precipitación: 1650 mm A^{-1} ; Temperatura : 21°C ; Brillo solar: 1800 h. A^{-1} .

• MEDIO DE CULTIVO

Los tratamientos consistieron en dos tipos de suelos caracterizados físico-químicamente: Andisol e Inceptisol, provenientes de los municipios de Sabaneta y Santa Rosa de Osos, Antioquia, dos dosis de biosólidos 0 y 20 TM Ha^{-1} de la PTAR San Fernando de Medellín, con un contenido 93 mg Kg^{-1} de cromo total, dos dosis de dicromato de potasio 0 y 2400 mg Kg^{-1} y cuatro microorganismos con potencial para reducir Cr^{+6} a Cr^{+3} . Todos los tratamientos fueron acondicionados con un geo-textil para dividir el suelo rizosférico del no rizosférico (figura 20). Se diseñaron Rizopots adaptados de Silva, (2006), consistentes en macetas plásticas cónicas de 28 cm h x 23 cm \varnothing M y 20 cm \varnothing m y una estructura tubular en Geo-Textil calibre No. 18, de 26 cm h x de 15 cm \varnothing dispuesta en el centro, para aislar el suelo rizosférico del no rizosférico.



Ilustración 20. Llenado de macetas con Rizopot central para separar suelo rizosférico.

Las macetas se llenaron con 2 kg de suelo base húmeda (20%) y 10 gramos de biosólido del 65 % de humedad e inoculadas con dos especies de bacterias *Ochrobactrum sp* y *Bacillus* 1.5×10^9 células en 20 mL, con base en la escala McFarland N° 5; se adicionaron 10 mL de suspensión bacteriana a cada tratamiento y dos especies de hongos *Trichoderma sp.* y *Paecilomyces lilacinus*, seleccionados en biotests precedentes, por su capacidad para reducir cromo hexavalente a trivalente. Controles sin biosólido y sin inoculación microbiana fueron instalados.

Se utilizaron plantas de frijol arbustivo *P. vulgaris* como bioindicador de la toxicidad del cromo. La humedad se mantuvo a capacidad de campo. Los lixiviados se recogieron en viales plásticos y se colectaron para evaluar un eventual balance de masas.

Las diferentes estructuras vegetales de la planta como raíz, tallo y hojas fueron cosechadas y almacenadas en bolsas de papel para correr un balance de masas si fuese necesario. Las flores fueron cortadas desde el momento de su emisión por estar fuera del interés agronómico todos los parámetros de producción.

El ensayo tuvo una duración de 16 semanas al cabo de las cuales se cosecharon 100 gramos de suelo rizosférico y no rizosférico y se empacaron al vacío a temperatura ambiente para determinar el contenido de cromo total en plasma y Cr^{6+} por el método colorimétrico mediante el uso de 1.5 difenilcarbazida. Muestras de 12 tratamientos fueron enviadas al laboratorio de genómica, proteómica y transcriptómica SIU, de la Universidad de Antioquia para una prueba de metadiversidad bacteriana.

• OBTENCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Los microorganismos fueron seleccionados de pruebas precedentes por su potencial capacidad reductora de cromo hexavalente, evaluada hasta 1200 ppm para hongos y 250 ppm para bacterias se cultivaron en PDA y AN y posteriormente inoculados al suelo homogéneamente en dosis de 5 mL del consorcio microbiano concentrado a 8.9×10^9 UFC en 50 mL agua destilada por cada maceta, de acuerdo con los siguientes tratamientos :

- Tratamiento 1 Andisol Rizosférico (AR)
- Tratamiento 2 AR + Biosólido (B)
- Tratamiento 3 AR + Biosólido+ Cromo (Cr)
- Tratamiento 4 AR + B+ (Cr)+ Microorganismos (M)
- Tratamiento 5 Andisol (A)
- Tratamiento 6 A + B
- Tratamiento 7 A + B + Cr
- Tratamiento 8 A + B + Cr + M

Para el suelo de tipo Inceptisol, fueron diseñados los mismos tratamientos

- MEDICIÓN DEL CROMO TOTAL Y HEXAVALENTE

El cromo total fue determinado empleando el método EPA 3050B, mediante una digestión ácida de 0.5 g de la muestra diluida en 2 mL de ácido nítrico concentrado, adicionado con 4 mL de peróxido de hidrógeno y 6 mL de agua, durante 30 minutos al horno digestor microondas a 180°C, antes de leerlo por emisión atómica (Agilent Technologies 4100 MP-AES).

Para el cromo hexavalente, se empleó el método EPA 3060A, consistente en una digestión alcalina con una solución de carbonato de sodio e hidróxido de sodio a 96°C, durante 60 minutos en parrilla de calentamiento con agitación. Este método determina el Cr^{6+} por espectrofotometría ultravioleta-visible, mediante el uso de difenilcarbazida, que a una absorbancia de 540 nm refleja el color violeta y es directamente proporcional a la concentración del cromo en el analito.

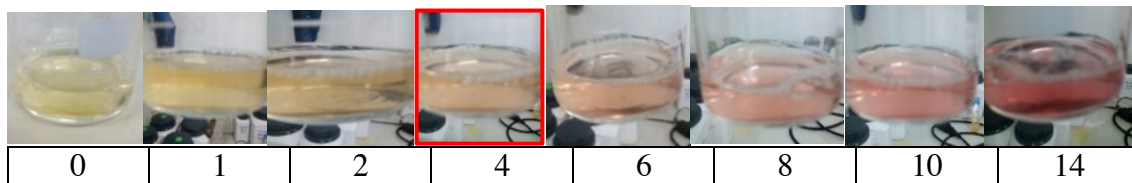


Ilustración 21. Calibración de la prueba de color lila a 540 nm, que confirma la presencia de Cr^{6+} con adiciones crecientes de 50 μl . En 0,1,2, la concentración es tan baja que no refleja el color.

- ANÁLISIS DE METADIVERSIDAD BACTERIANA

El protocolo de extracción del DNA estandarizado se realizó usando el kit de *Fast DNA SPIN Kit for Soil*. Elución de la muestra en 100 μL de Buffer de elución.

Al finalizar el proceso de extracción, se hizo la cuantificación del DNA por el método de absorción de luz a 260 nm (Nanodrop) y por el método colorimétrico Picogreen DNA (Quant-It PicoGreen dsDNA) con coloración.

El secuenciamiento se hizo en la plataforma MiSeq de Illumina generando reads pareados de 300 bases cada uno. Los análisis de calidad de secuencias, formación de OTUs (3%) y clasificación, se desarrollaron utilizando la plataforma MOTHUR en su versión 1.38.1. Se procesaron 20000 Reads por muestra. La clasificación de las bacterias se hizo con el programa RDP classiffier.

- ANÁLISIS DE DATOS

El diseño estadístico correspondió a un factorial incompleto de 2 x 5 con tres repeticiones totalmente al azar y fue corrido en SAS, procedimiento Mixed y GENMOD; método de estimación REML, mediante una prueba de medias de mínimos cuadrados, donde Cr^{6+} fue la variable dependiente.

2.3.5. RESULTADOS



Ilustración 22. Frijol 4 semanas de sembrado, crecimiento sobre Inceptisol no rizosférico.

Las tablas 15 y 16 contienen los valores del porcentaje de cromo hexavalente respecto del Cr total en suelos de tipo Andisol vs. Inceptisol, adicionados con dos niveles de biosólidos, 0 y 20 TM Ha^{-1} , enriquecidos con un consorcio microbial de dos especies bacteriales *Ochrobactrum sp* y *Bacillus sp.* y dos especies de hongos *Trichoderma sp* y *Paecilomyces lilacinus*, enriquecidos con dicromato de potasio como fuente de Cr^{6+} a dos niveles, 0 y 2400 ppm con lecturas a nivel rizosférico y no rizosférico, en presencia de frijol arbustivo, durante 120 días.

El arreglo estadístico, que no requirió otra transformación que la forma logarítmica de los valores originales, presenta tanto factores fijos como factores aleatorios, por lo que fue necesario recurrir a un modelo estadístico mixto, incompleto y no homogéneo, en el cual la estructura de varianzas es diferente a la del modelo lineal. Por lo tanto es preciso mirar las interacciones dobles y/o triples entre factores, antes que los efectos principales individuales. De ésta forma, plantean Gómez et al., (2012) que el modelo mixto proporciona un ambiente óptimo para responder los interrogantes explorados y en él se da respuesta a una de las limitaciones que presenta el análisis de varianza multivariado.

En el reporte estadístico completo, con sus tests y exploraciones agotadas (anexo C-1.) se observa que algunos efectos principales individuales no tienen significancia estadística y sólo las interacciones dobles más relevantes si que las tienen y reflejan diferencia significativa, justificando la elección del modelo y eliminando el posible enmascaramiento asociado a efectos individuales. La variable que se tuvo en cuenta para correr el modelo, corresponde al porcentaje de cromo hexavalente residual, respecto del total adicionado inicialmente, medido al final del experimento.

En este capítulo sólo se presenta un resumen del test de normalidad y el resumen de las medias de mínimos cuadrados y sus diferencias, en los tratamientos e interacciones que mostraron significancia estadística, lo cual da cuenta de la confiabilidad en el tratamiento de los datos y verifica la decisión de recurrir a este tipo de modelo.

Tabla 15. Porcentaje de Cr⁶⁺ en suelo Andisol (A) rizosférico y no rizosférico, con 2 niveles de biosólido , 2 niveles de cromo y 2 niveles de microorganismos (*).

Suelo	Rizosfera	Biosólido	Microorganismos	Cromo	Cromo Total Plasma	Cr ⁶⁺ Plasma	% Cromo Cr ⁶	Cr ⁶⁺ Inicial en suelos
A	1	0	0	0	165,27	8,04	4,86	151
A	1	0	0	0	149,48	3,99	2,67	151
A	1	0	0	0	175,57	8,27	4,71	151
A	1	1	0	0	148,69	6,39	4,30	151
A	1	1	0	0	157,15	10,96	6,98	151
A	1	1	0	0	157,61	8,80	5,58	151
A	1	1	1	0	150,48	9,50	6,32	151
A	1	1	1	0	133,69	10,18	7,62	151
A	1	1	1	0	141,48	5,76	4,07	151
A	1	0	1	0	149,06	8,19	5,49	151
A	1	0	1	0	163,71	10,67	6,52	151
A	1	0	1	0	151,02	9,38	6,21	151
A	1	1	1	1	2542,91	13,62	0,54	151
A	1	1	1	1	2237,22	10,45	0,47	151
A	1	1	1	1	1784,86	15,98	0,90	151
A	1	1	0	1	2304,48	27,72	1,20	151
A	1	1	0	1	3004,93	33,32	1,11	151
A	1	1	0	1	2926,67	27,73	0,95	151
A	0	0	0	0	141,94	7,53	5,30	151
A	0	0	0	0	136,42	4,09	3,00	151
A	0	0	0	0	181,79	6,65	3,66	151
A	0	1	0	0	132,40	7,02	5,30	151
A	0	1	0	0	143,94	9,49	6,59	151
A	0	1	0	0	163,39	10,43	6,39	151
A	0	1	1	0	144,60	7,35	5,09	151
A	0	1	1	0	146,72	7,44	5,07	151
A	0	1	1	0	153,11	7,57	4,94	151
A	0	0	1	0	135,75	5,78	4,25	151
A	0	0	1	0	118,94	7,91	6,65	151
A	0	0	1	0	142,96	7,17	5,02	151
A	0	1	1	1	2113,30	5,63	0,27	151
A	0	1	1	1	2334,10	31,12	1,33	151
A	0	1	1	1	2019,98	23,75	1,18	151
A	0	1	0	1	2661,17	7,92	0,30	151
A	0	1	0	1	3202,84	7,38	0,23	151
A	0	1	0	1	1723,21	7,50	0,44	151

(*) A= suelo Andisol. rizosfera 1= suelo rizosférico. rizosfera 0 = suelo no rizosférico. biosólido 0= sin biosólido biosólido 1= 20 TM ha⁻¹. microorganismos 0 = sin microorganismos. microorganismos 1= *Ochrobactrum* + *Bacillus* + *Trichoderma* + *Paecilomyces*.

Tabla 16. Porcentaje de Cr⁶⁺ en suelo Inceptisol (I) rizosférico y no rizosférico, con 2 niveles de biosólido , 2 niveles de cromo y 2 niveles de microorganismos (*).

Suelo	Rizosfera	Biosólido	Microorganismos	Cromo	Cromo Total Plasma	Cr6+ Plasma	% Cromo Cr6+	Cr6+ Inicial en suelos
I	1	0	0	0	42,51	1,18	2,77	44
I	1	0	0	0	51,62	1,41	2,73	44
I	1	0	0	0	44,34	1,36	3,06	44
I	1	1	0	0	39,05	0,35	0,89	44
I	1	1	0	0	35,32	4,41	12,47	44
I	1	1	0	0	42,77	1,16	2,71	44
I	1	0	1	0	48,07	2,01	4,18	44
I	1	0	1	0	42,45	1,86	4,38	44
I	1	0	1	0	40,57	1,56	3,84	44
I	1	1	1	0	43,74	2,55	5,84	44
I	1	1	1	0	32,08	1,11	3,47	44
I	1	1	1	0	34,88	1,07	3,06	44
I	1	1	1	1	3426,28	605,31	17,67	44
I	1	1	1	1	5606,20	1239,32	22,11	44
I	1	1	1	1	7946,67	1285,73	16,18	44
I	1	0	1	1	4486,51	53,39	1,19	44
I	1	0	1	1	4559,62	396,39	8,69	44
I	1	0	1	1	3681,46	111,79	3,04	44
I	0	0	0	0	46,12	0,82	1,77	44
I	0	0	0	0	43,61	1,04	2,38	44
I	0	0	0	0	45,01	1,09	2,43	44
I	0	1	0	0	45,49	1,59	3,49	44
I	0	1	0	0	33,15	1,55	4,68	44
I	0	1	0	0	36,96	0,41	1,11	44
i	0	0	1	0	42,78	1,22	2,86	44
i	0	0	1	0	44,41	1,38	3,10	44
I	0	0	1	0	41,67	1,11	2,66	44
I	0	1	1	0	35,98	0,90	2,51	44
I	0	1	1	0	37,60	1,11	2,96	44
I	0	1	1	0	35,66	1,03	2,87	44
I	0	1	1	1	2792,14	438,90	15,72	44
I	0	1	1	1	1145,29	744,70	65,02	44
I	0	1	1	1	2470,13	279,69	11,32	44
I	0	0	1	1	2971,69	348,86	11,74	44
I	0	0	1	1	2053,20	240,94	11,73	44
I	0	0	1	1	3493,18	96,63	2,77	44

(*) I= suelo Inceptisol. rizosfera 1= suelo rizosférico. rizosfera 0 = suelo no rizosférico. biosólido 0 = sin biosólido biosólido 1= 20 TM ha⁻¹. microorganismos 0 = sin microorganismos. microorganismos 1= *Ochrobactrum* + *Bacillus* + *Trichoderma* + *Paecilomyces*.

Tabla 17. Test para normalidad. Kolmogorov-Smirnov

Tests para normalidad				
Test	Estadístico		p valor	
Shapiro-Wilk	W	0.982667	Pr < W	0.4243
Kolmogorov-Smirnov	D	0.086902	Pr > D	>0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq	0.106386	Pr > W-Sq	0.0929
Anderson-Darling	A-Sq	0.568536	Pr > A-Sq	0.1402

Tabla 18. Test tipo 3 de efectos fijos Programa SAS, procedimiento Mixed, corrido sobre los datos de las tablas 15 y 16. Variable evaluada % Cr⁶⁺. Grados de libertad, valor y probabilidad de F.

Tests de tipo 3 de efectos fijos				
Efecto	Num. DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
su	1	55	22.45	<.0001
ri	1	55	0.52	0.4732
su*ri	1	55	0.74	0.3950
bi	1	55	31.73	<.0001
su*bi	1	55	0.26	0.6112
ri*bi	1	55	0.00	0.9620
mi	1	55	1.18	0.2817
su*mi	1	55	0.49	0.4887
ri*mi	1	55	4.35	0.0416
bi*mi	1	55	6.26	0.0154
cr	1	55	0.01	0.9257
su*cr	1	55	31.17	<.0001
ri*cr	1	55	1.30	0.2589
bi*cr	1	55	25.04	<.0001
mi*cr	1	55	0.57	0.4521
su*ri*cr	1	55	1.23	0.2714

Ilustración 23. Elementos del tests de normalidad programa SAS, procedimiento Mixed residuales de Student para Cr^{6+} corrido sobre los datos de las tablas 15 y 16.

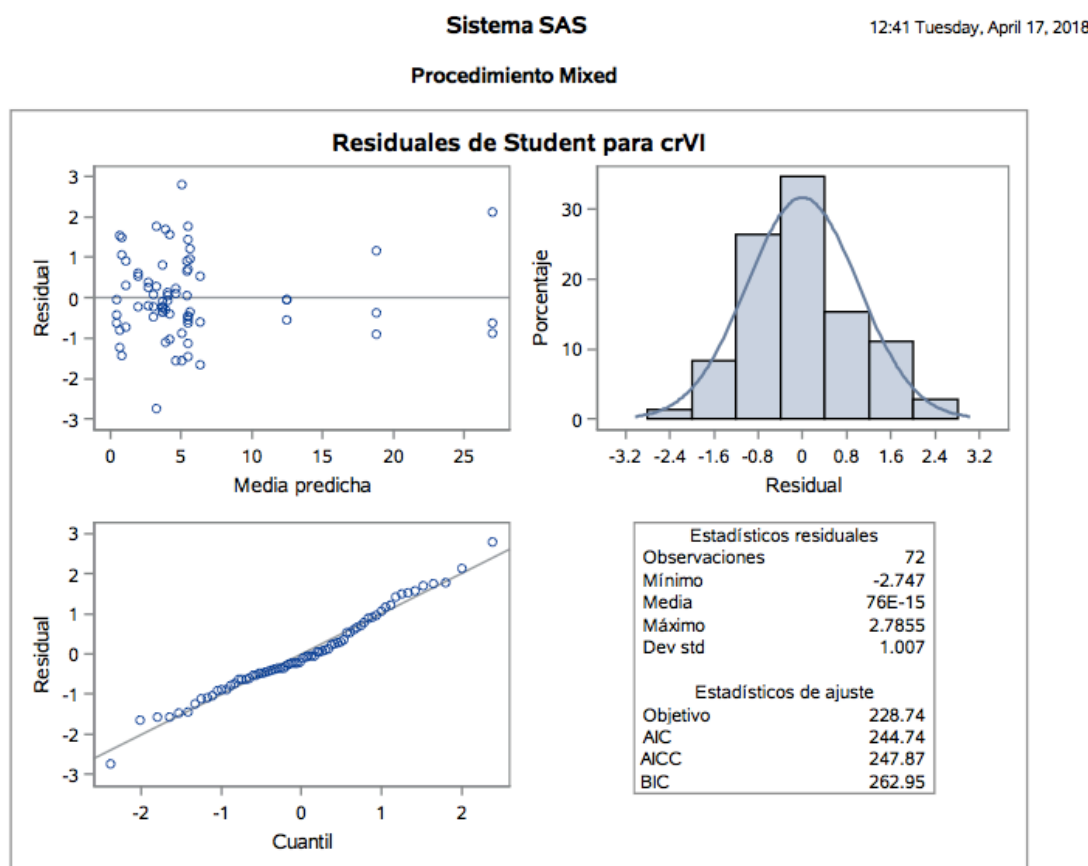


Tabla 19. Promedios de mínimos cuadrados para efectos principales e interacciones dobles programa SAS, procedimiento Mixed datos procesados de las tablas 15 y 16.

Efecto	su	ri	bi	mi	cr	Estimador	Error estándar	Valor t	Pr > t	Inferior	Superior
su	A					3.7634	0.1642	22.93	<.0001	3.4344	4.0924
su	I					7.4837	1.3871	5.40	<.0001	4.7039	10.2634
ri		0				6.0038	1.3421	4.47	<.0001	3.3142	8.6935
ri		1				5.2433	0.3870	13.55	<.0001	4.4678	6.0187
bi			0			4.8711	0.8963	5.43	<.0001	3.0748	6.6674
bi			1			6.1610	0.6408	9.61	<.0001	4.8767	7.4453
mi				0		3.5884	0.2431	14.76	<.0001	3.1013	4.0756
mi				1		7.0772	1.1759	6.02	<.0001	4.7206	9.4337
cr					0	4.3504	0.2475	17.58	<.0001	3.8545	4.8464
cr					1	8.1697	2.0359	4.01	0.0002	4.0898	12.2497
su*cr	A				0	5.2745	0.2414	21.85	<.0001	4.7907	5.7582
su*cr	A				1	0.7413	0.09728	7.62	<.0001	0.5464	0.9363
su*cr	I				0	3.4264	0.4321	7.93	<.0001	2.5604	4.2924
su*cr	I				1	15.5982	4.0706	3.83	0.0003	7.4406	23.7557
bi*cr			0		0	4.0094	0.3240	12.38	<.0001	3.3602	4.6586
bi*cr			0		1	8.3179	4.3126	1.93	0.0589	-0.3247	16.9605
bi*cr			1		0	4.6915	0.3240	14.48	<.0001	4.0422	5.3407
bi*cr			1		1	8.1204	1.4390	5.64	<.0001	5.2366	11.0042
ri*mi		0		0		3.0367	0.2169	14.00	<.0001	2.6019	3.4714
ri*mi		0		1		8.1232	2.2949	3.54	0.0008	3.5241	12.7224
ri*mi		1		0		4.1402	0.4073	10.17	<.0001	3.3240	4.9564
ri*mi		1		1		6.0311	0.5023	12.01	<.0001	5.0246	7.0377
bi*mi			0	0		3.5324	0.4062	8.70	<.0001	2.7184	4.3463
bi*mi			0	1		5.7636	1.4591	3.95	0.0002	2.8394	8.6878
bi*mi			1	0		3.6258	0.2719	13.33	<.0001	3.0808	4.1708
bi*mi			1	1		8.0624	1.0945	7.37	<.0001	5.8689	10.2558

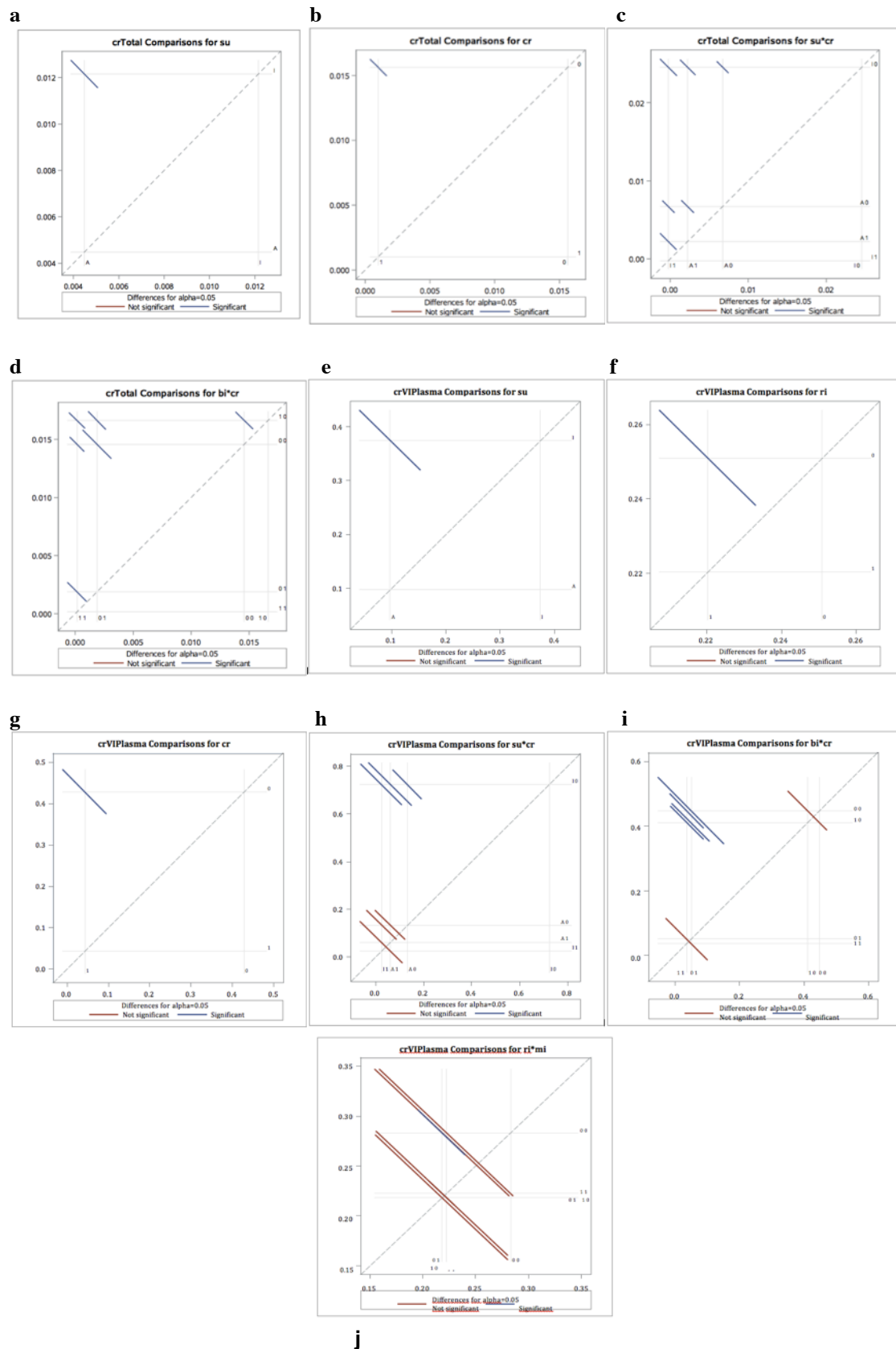


Ilustración 24. Procedimiento GENMOD para confirmar significancia estadística de los efectos principales e interacciones. Variable dependiente cromo total **a**: suelo ; **b**: cromo ; **c**: suelo*cromo ; **d**: biosólido*cromo ; variable Cr⁶⁺ plasma **e**: suelo ; **f**: rizosfera ; **g**: cromo ; **h**: suelo*cromo ; **i**: biosólido*cromo ; **j**: rizosfera*microorganismos.

Tabla 20. Promedios de mínimos cuadrados para valores de Cr^{6+} en las tablas 15 y 16 correspondientes al tipo de suelo, nivel de cromo y biosólido adicionado y para las interacciones su^*Cr y bi^*Cr . Variable analizada cromo total.

	su	Estimador	Error estándar	z valor	Pr > z	Inferior	Superior	Media	Error estándar de la media	Media inferior	Media superior
	A	0.004478	0.000406	11.02	<.0001	0.003681	0.005275	223.31	20.2697	189.58	271.63
	I	0.01216	0.000523	23.24	<.0001	0.01113	0.01318	82.2678	3.5399	75.8694	89.8448
Cr											
	0	0.01562	0.000384	40.72	<.0001	0.01487	0.01637	64.0247	1.5722	61.0848	67.2620
	1	0.001015	0.000571	1.78	0.0755	-0.00010	0.002133	985.66	554.62	-9582.62	468.72
su Cr											
	A 0	0.006709	0.000202	33.23	<.0001	0.006313	0.007105	149.05	4.4852	140.75	158.39
	A 1	0.002247	0.000790	2.85	0.0044	0.000699	0.003795	445.02	156.40	263.51	1430.09
	I 0	0.02453	0.000740	33.15	<.0001	0.02308	0.02598	40.7683	1.2299	38.4924	43.3303
	I 1	-0.00022	0.000776	-0.28	0.7788	-0.00174	0.001303	-4587.14	16329	-575.04	767.46
bi Cr											
	0 0	0.01459	0.000499	29.21	<.0001	0.01361	0.01557	68.5545	2.3467	64.2443	73.4846
	0 1	0.001878	0.000936	2.01	0.0448	0.000044	0.003712	532.49	265.38	269.37	22946
	1 0	0.01665	0.000582	28.62	<.0001	0.01551	0.01779	60.0565	2.0983	56.2075	64.4715
	1 1	0.000151	0.000379	0.40	0.6904	-0.00059	0.000895	6617.23	16611	-1688.03	1117.76

Tabla 21. Promedios de mínimos cuadrados programa SAS procedimiento Mixed sobre datos presentados en las tablas 15 y 16 correspondientes al tipo de suelo (Andisol e Inceptisol), Cromo adicionado (0 y 2400 ppm de Cr⁶⁺), suelo rizosférico y no rizosférico, Interacción su*Cr , interacción bi*Cr e interacción ri*mi. Variable dependiente Cr⁶⁺ Plasma.

su	Estimador	Error estándar	z valor	Pr > z	Inferior	Superior	Media	Error estándar de la media	Media inferior	Media superior
A	0.09700	0.03295	2.94	0.0032	0.03242	0.1616	10.3094	3.5017	6.1891	30.8412
I	0.3742	0.04511	8.29	<.0001	0.2858	0.4626	2.6724	0.3222	2.1616	3.4992
Cr										
0	0.4284	0.03140	13.64	<.0001	0.3668	0.4899	2.3344	0.1711	2.0411	2.7261
1	0.04282	0.04500	0.95	0.3413	-0.04538	0.1310	23.3535	24.5435	-22.0351	7.6323
ri										
0	0.2509	0.02822	8.89	<.0001	0.1956	0.3062	3.9862	0.4484	3.2660	5.1137
1	0.2203	0.02785	7.91	<.0001	0.1657	0.2749	4.5387	0.5738	3.6374	6.0337
su Cr										
A 0	0.1330	0.01133	11.74	<.0001	0.1108	0.1552	7.5188	0.6403	6.4433	9.0253
A 1	0.06100	0.06416	0.95	0.3417	-0.06474	0.1867	16.3940	17.2426	-15.4453	5.3550
I 0	0.7238	0.06172	11.73	<.0001	0.6028	0.8447	1.3817	0.1178	1.1838	1.6590
I 1	0.02464	0.06381	0.39	0.6993	-0.1004	0.1497	40.5809	105.08	-9.9586	6.6800
bi Cr										
0 0	0.4464	0.04603	9.70	<.0001	0.3562	0.5366	2.2401	0.2310	1.8635	2.8074
0 1	0.04907	0.07247	0.68	0.4984	-0.09298	0.1911	20.3791	30.0993	-10.7552	5.2324
1 0	0.4103	0.04266	9.62	<.0001	0.3267	0.4939	2.4370	0.2533	2.0245	3.0606
1 1	0.03657	0.03179	1.15	0.2500	-0.02573	0.09887	27.3446	23.7692	-38.8587	10.1138
ri mi										
0 0	0.2834	0.05447	5.20	<.0001	0.1766	0.3901	3.5288	0.6783	2.5631	5.6618
0 1	0.2183	0.02722	8.02	<.0001	0.1650	0.2717	4.5798	0.5710	3.6805	6.0608
1 0	0.2182	0.05335	4.09	<.0001	0.1136	0.3227	4.5832	1.1206	3.0985	8.8004
1 1	0.2225	0.02740	8.12	<.0001	0.1688	0.2762	4.4950	0.5535	3.6210	5.9250

Tabla 22. Diferencias de Medias de mínimos cuadrados, programa SAS procedimiento mixed sobre datos presentados en las tablas 15 y 16 correspondientes al tipo de suelo (Andisol e Inceptisol), Cromo adicionado (0 y 2400 ppm de Cr^{6+}), Interacción su*Cr e interacción bi*Cr. Variable dependiente cromo total.

Error estándar											
su		_su		Estimador		z valor		Pr > z		Inferior	Superior
A		I		-0.00768	0.000612	-12.55	<.0001	-0.00888	-0.00648		
Cr		Cr									
0		1		0.01460	0.000665	21.95	<.0001	0.01330	0.01591		
su		Cr		su		Cr					
A	0	A	1	0.004462	0.000817	5.46	<.0001	0.002860	0.006064		
A	0	I	0	-0.01782	0.000767	-23.24	<.0001	-0.01932	-0.01632		
A	0	I	1	0.006927	0.000799	8.66	<.0001	0.005360	0.008494		
A	1	I	0	-0.02228	0.000997	-22.34	<.0001	-0.02424	-0.02033		
A	1	I	1	0.002465	0.001072	2.30	0.0214	0.000365	0.004565		
I	0	I	1	0.02475	0.001098	22.54	<.0001	0.02260	0.02690		
bi		Cr		bi		Cr					
0	0	0	1	0.01271	0.001253	10.15	<.0001	0.01025	0.01516		
0	0	1	0	-0.00206	0.000766	-2.69	0.0071	-0.00357	-0.00056		
0	0	1	1	0.01444	0.000639	22.61	<.0001	0.01318	0.01569		
0	1	1	0	-0.01477	0.000790	-18.69	<.0001	-0.01632	-0.01322		
0	1	1	1	0.001727	0.000858	2.01	0.0441	0.000045	0.003409		
1	0	1	1	0.01650	0.000702	23.51	<.0001	0.01512	0.01788		

Tabla 23. Diferencias de medias de mínimos cuadrados programa SAS procedimiento Mixed sobre datos presentados en las tablas 15 y 16 correspondientes al tipo de suelo (Andisol e Inceptisol), Cromo adicionado (0 y 2400 ppm de Cr6+), suelo rizosférico y no rizosférico, Interacción su*Cr , interacción bi*Cr e interacción ri*mi. Variable evaluada Cr6+. Plasma.

Error estándar										
su _su		Estimador		z valor		Pr > z	Alfa	Inferior	Superior	
A	I	-0.2772	0.05718	-4.85	<.0001	0.05	-0.3893	-0.1651		
Cr Cr										
0	1	0.3856	0.05523	6.98	<.0001	0.05	0.2773	0.4938		
ri ri										
0	1	0.03054	0.01315	2.32	0.0202	0.05	0.004768	0.05631		
su Cr su Cr										
A	0	A	1	0.004462	0.000817	5.46	<.0001	0.05	0.002860	0.006064
A	0	I	0	-0.01782	0.000767	-23.24	<.0001	0.05	-0.01932	-0.01632
A	0	I	1	0.006927	0.000799	8.66	<.0001	0.05	0.005360	0.008494
A	1	I	0	-0.02228	0.000997	-22.34	<.0001	0.05	-0.02424	-0.02033
A	1	I	1	0.002465	0.001072	2.30	0.0214	0.05	0.000365	0.004565
I	0	I	1	0.02475	0.001098	22.54	<.0001	0.05	0.02260	0.02690
Bi Cr bi Cr										
0	0	0	1	0.3973	0.1054	3.77	0.0002	0.05	0.1907	0.6040
0	0	1	0	0.03607	0.06271	0.58	0.5652	0.05	-0.08684	0.1590
0	0	1	1	0.4098	0.05489	7.47	<.0001	0.05	0.3023	0.5174
0	1	1	0	-0.3613	0.06006	-6.01	<.0001	0.05	-0.4790	-0.2435
0	1	1	1	0.01250	0.06652	0.19	0.8510	0.05	-0.1179	0.1429
1	0	1	1	0.3738	0.05313	7.04	<.0001	0.05	0.2696	0.4779
ri mi ri mi										
0	0	0	1	0.06504	0.06504	1.00	0.3173	0.05	-0.06244	0.1925
0	0	1	0	0.06520	0.02296	2.84	0.0045	0.05	0.02019	0.1102
0	0	1	1	0.06092	0.06487	0.94	0.3477	0.05	-0.06623	0.1881
0	1	1	0	0.000161	0.06418	0.00	0.9980	0.05	-0.1256	0.1259
0	1	1	1	-0.00412	0.01252	-0.33	0.7420	0.05	-0.02867	0.02042
1	0	1	1	-0.00428	0.06395	-0.07	0.9466	0.05	-0.1296	0.1210

- ANÁLISIS DE METADIVERSIDAD BACTERIANA

Tabla 24. Secuenciamiento Gen ribosomal 16S (región variable V3-V4). 12 tratamientos de suelos rizosféricos Andisol e Inceptisol con adición de *Ochrobactrum* y *Bacillus*.

Muestra	Descripción	Observaciones
IOX	Suelo inceptisol	Textura arcillo-arenosa
IOO	Inceptisol + micro organismos (M.O)	
IMO	Inceptisol + biosólido + M.O.	
IMX	Inceptisol + biosólido	
ITO	Inceptisol + M.O. + Ct ⁶⁺	
ITX	Inceptisol + biosólido + M.O. + Ct ⁶⁺	Textura franco arenosa
AOX	Suelo andisol	
AOO	Andisol + M.O.	
AMO	Andisol + biosólido + M.O.	
AMX	Andisol + biosólido	
ATO	Andisol M.O. + Ct ⁶⁺	
ATX	Andisol + biosólido + M.O. + Ct ⁶	

Extracción del DNA

Tabla 25. Muestras correspondientes a 12 tratamientos de suelos rizosféricos Andisol e Inceptisol con adición de *Ochrobactrum* y *Bacillus*.

Muestra	Concentración A260 - Nanodrop	Concentración - Picogreen
IOX	49,7 ng/ μ L	26,3 ng/ μ L
IOO	32,2 ng/ μ L	22,2 ng/ μ L
IMO	29,1 ng/ μ L	22 ng/ μ L
IMX	67,4 ng/ μ L	21,6 ng/ μ L
ITO	27,5 ng/ μ L	27 ng/ μ L
ITX	45,8 ng/ μ L	10 ng/ μ L
AOX	197 ng/ μ L	32,6 ng/ μ L
AOO	184,7 ng/ μ L	38,2 ng/ μ L
AMO	262 ng/ μ L	50 ng/ μ L
AMX	293 ng/ μ L	46,9 ng/ μ L
ATO	305,3 ng/ μ L	10 ng/ μ L
ATX	232,2 ng/ μ L	10 ng/ μ L

Control de Amplificación gen 16S completo

En la PCR se utilizó los oligos **27F**: 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' y **1492R**: 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3' que amplifican un fragmento de 1500 bases pb.

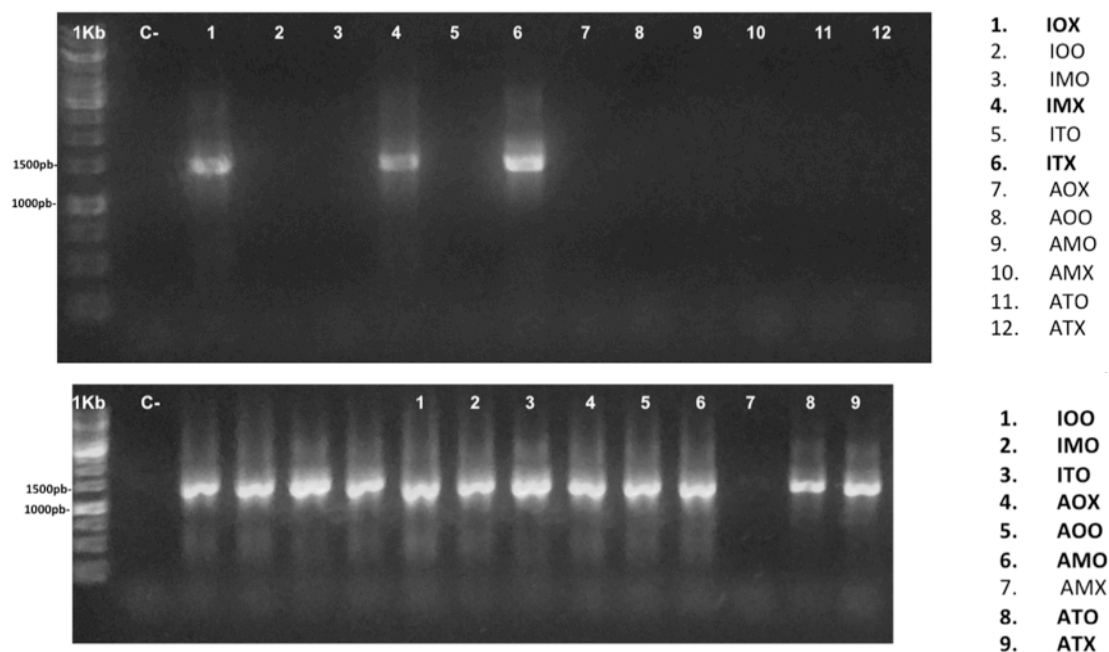


Ilustración 25. Gel de Agarosa. Control de amplificación.

Secuenciamiento

Para el secuenciamiento profundo del gen ribosomal 16S, región variable V3 y V4, se utilizaron los oligos:

Bakt_341F CCTACGGGNGGCWGCAG

Bakt_805R GACTACHVGGGTATCTAATCC

Tabla 26. Resultados del secuenciamiento profundo de las 12 librerías correspondientes a suelos rizosféricos Andisol e Inceptisol con adición de *Ochrobactrum* y *Bacillus*.

Nombre del archivo	Número de reads generados (300 bases, PE)	Porcentaje de bases calidad >Q30
AMO_009	224.888	84,99
AMX_010	157.328	85,11
AOO_008	180.642	84,47
AOX_007	235.728	85,25
ATO_011	187.100	85,43
ATX_012	210.776	86,46
IMO_003	188.788	85,14
IMX_004	188.342	84,92
IOO_002	197.226	85,07
IOX_001	242.776	85,27
ITO_005	189.078	86,92
ITX_006	215.792	84,99

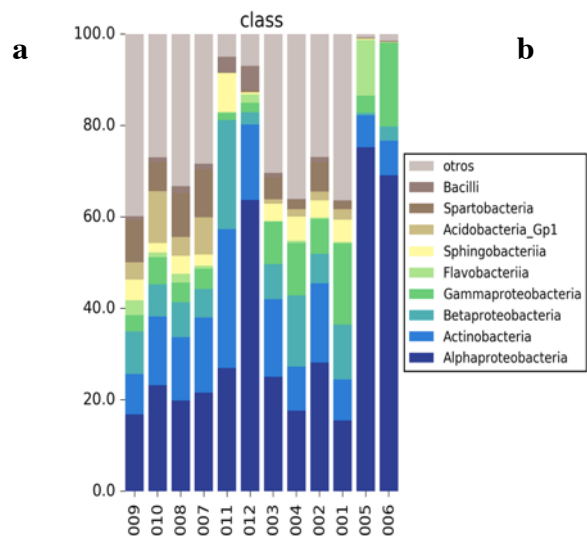
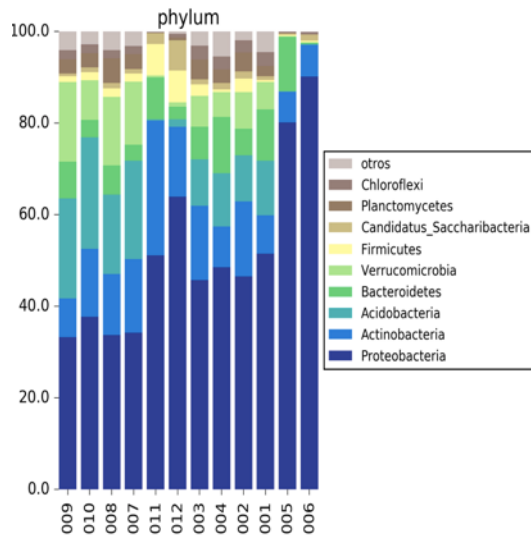
Bases ambiguas, homopolimeros mayores a 6 bases, amplicones quiméricos y secuencias no correspondientes al gen 16S bacteriano removido.

Tabla 27. Secuencias depuradas por librería de 12 muestras evaluadas para metadiversidad bacteriana correspondientes a suelos rizosféricos Andisol e Inceptisol con adición de *Ochrobactrum* y *Bacillus*.

Muestra	Secuencias depuradas (Ambigüedades, homopolimeros, quimeras, arqueas y eucariotas, no clasificables)
AMO009	4076
AMX010	7436
AOO008	6043
AOX007	4360
ATO011	12220
ATX012	10614
IMO003	4179
IMX004	5018
IOO002	3805
IOX001	4992
ITO005	10986
ITX006	9224

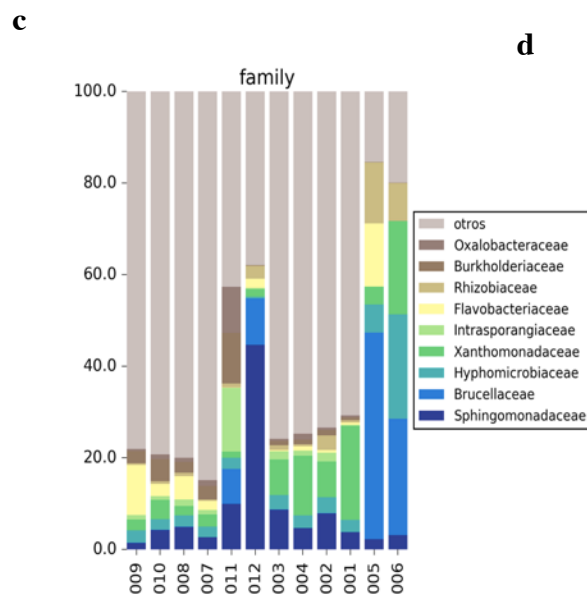
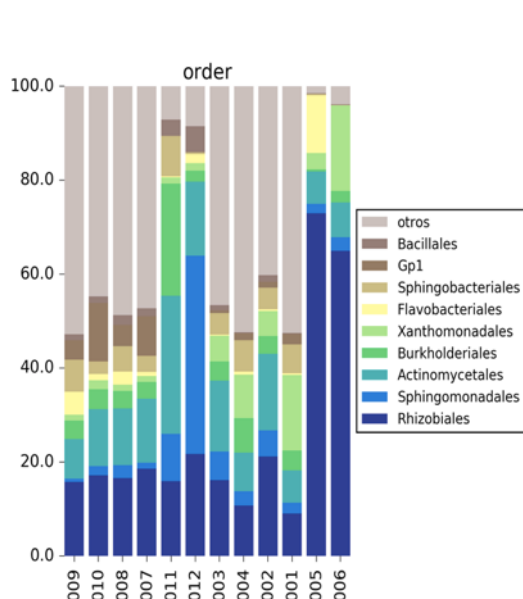
Tabla 28. Análisis de diversidad de los OTUs al 3%. Resultados de análisis de diversidad alfa obtenidos con el programa MOTHUR correspondientes a suelos rizosféricos Andisol e Inceptisol con adición de *Ochrobactrum* y *Bacillus*.

Group	nseqs	Coverage	Sobs	Invsimpson	Invsimpson_lci	Invsimpson_hci	Shannon	Shannon_lci	Shannon_hci
AMO009	3805	0,897464	896,994	155,583539	143,271974	170,210002	5,933438	5,886335	5,980541
AMX010	3805	0,89145	903,666	128,391284	116,738684	142,630278	5,864827	5,815263	5,91439
AOO008	3805	0,875213	1045,945	172,474311	156,529192	192,03809	6,134468	6,086751	6,182185
AOX007	3805	0,887628	912,888	117,240851	106,554205	130,310337	5,84117	5,790253	5,892086
ATO011	3805	0,968896	260,898	18,318461	17,422534	19,311553	3,659923	3,606395	3,713452
ATX012	3805	0,950325	342,788	7,225191	6,777408	7,736336	3,268122	3,197442	3,338802
IMO003	3805	0,878767	1023,813	168,00389	151,387376	188,718176	6,120483	6,073238	6,167727
IMX004	3805	0,875154	1077,473	294,535111	269,104577	325,278001	6,336971	6,296298	6,377645
IOO002	3805	0,890933	959	109,416114	97,921604	123,968084	5,944452	5,892819	5,996086
IOX001	3805	0,90515	844,757	163,545093	150,543483	179,005346	5,895343	5,850209	5,940478
ITO005	3805	0,979614	158,586	3,99091	3,795509	4,207523	2,294605	2,232479	2,356731
ITX006	3805	0,972804	207,246	7,756363	7,424319	8,119505	2,860743	2,801036	2,920451



Los diagramas de barras **a**, **b**, **c**, **d**, **e** presentan una comparación por Phyla, Clase, Orden , Familia y Género de mayor abundancia encontrados en las muestras correspondientes a los tratamientos que tuvieron adición de microorganismos en suelo rizosférico.

Como puede apreciarse en la ilustración 25 **e** correspondiente a género, con excepción de *Rhizobium* y *Ochrobactrum*, los demás géneros que aparecen en el análisis no han sido reportados por otros autores removiendo cromo. Lo anterior abre un horizonte importante para explorar con algunos de los géneros que pueden ser cultivados como *Burkholderia*, por ejemplo, aunque en realidad es posible que muchos de tales géneros al provenir de muestras de biosólidos, puedan estar ejerciendo algún papel remediador que bien podría ser sobre cromo, o sobre algún otro metal presente o algún otro contaminante inorgánico que pueda contener el biosólido, independiente de la concentración presente en las muestras.



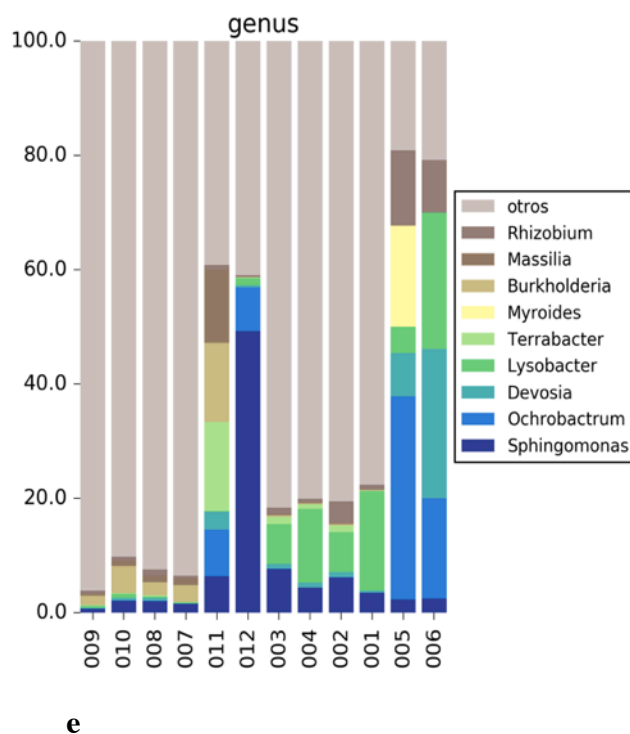


Ilustración 26. Comparación a nivel de categoría taxonómica **a** Phyla, **b** Clase ; **c** Orden, **d** Familia y **e** Género de los grupos más abundantes encontrados en las muestras analizadas.

2.3.6. DISCUSIÓN

2.3.6.1 Análisis estadístico

Puede apreciarse que la interacciones dobles rizosfera (ri) por microorganismos (mi), $ri*mi$; suelo (su) por cromo (cr), $su*cr$; biosólidos (bi) por cromo (cr), $bi*cr$ y biosólidos por microorganismos, $bi*mi$, son significativas estadísticamente.

Respecto de los factores individuales, se observa que el contenido natural de cromo total del Andisol triplica el del Inceptisol (151 vs. 44) lo cual dificulta la interpretación siendo necesario recurrir al % de cromo hexavalente remanente como variable dependiente. No obstante, la adición del metal a los tratamientos que lo contienen es tan alta, que desdibuja cualquier diferencia que pueda atribuirse a éste desbalance del cromo inicial.

La interacción suelo*cromo ($su*cr$), resulta muy reveladora y confirmaría lo encontrado por otros autores que mencionan que la facultad para remover cromo de algunos microorganismos se incrementa en presencia de altos contenidos del metal (Tewari et al., 2005). En este caso se confirma tanto para el Andisol como para el Inceptisol que cuando son adicionadas cantidades altas, correspondientes a 2400 ppm de Cr^{6+} o superiores , se presentan los mayores porcentajes de remoción de cromo y todas las otras variables perderían relevancia siendo superadas significativamente por la variable cromo. Otros autores sin embargo, afirman que cuando el medio receptor sobrepasa su capacidad como sumidero, cesa el efecto de remoción y transformación del cromo por efecto de los microorganismos (Shanker et al., 2005).

Otro aspecto relevante de los factores individuales, es que el contenido de materia orgánica presente en el Andisol, debería superar ampliamente la capacidad de reducción de Cr^{6+} respecto

del Inceptisol cuyos tenores de materia orgánica son inferiores; los resultados encontrados confirman este aspecto, aunque en valores absolutos, las cifras muestran lo contrario, pero no debe perderse de vista que los contenidos naturales de cromo del Andisol, triplican los del Inceptisol.

Como efectos principales, la rizosfera y los microorganismos no mostraron significancia estadística, contradiciendo lo que se esperaba. La interacción $ri*mi$, en cambio resultó ser significativa. Es difícil delimitar las condiciones rizosféricas en una maceta de 2 kilos de volumen de suelo y es posible que el mecanismo diseñado para contener una raíz fasciculada como la del frijol no sea el ideal. Así mismo, resulta difícil reproducir las condiciones naturales para que se consiga en una maceta un sistema rizosférico activo y biodiverso. Finalmente es altamente posible que el *Rhizobium* asociado de manera natural al frijol y puesto en evidencia por los nódulos radicales al momento de la cosecha, hubiese generado una reducción de la forma hexavalente en todos los tratamientos, cuya capacidad reductora quedó demostrada en el experimento A de esta investigación.

Lo heterogéneo e incompleto del modelo, limita las conclusiones a la hora de observar el efecto individual de Cr^{6+} adicionado, el cual sólo fue inoculado en los tratamientos que contenían todas las variables (tipo de suelo, influencia rizosférica, biosólido y consorcio microbiano), pues justo en dichos tratamientos se consiguió una remoción del cromo hexavalente no esperada, superior al 90 % y el frijol se comportó bien (sin ser objeto de este ensayo). Resulta por tanto difícil separar efectos aunque puede colegirse que existe una diferencia importante a favor del efecto rizosférico en el Andisol, más no comparable con el Inceptisol.

La única interacción triple, para la cual existían datos completos fue, $suelo*rizosfera*cromo$, $su*ri*cr$, resultó no significativa. Cabría pensarse que en el diseño de un modelo homogéneo y completo, no sólo podría esperarse mayor significancia de las interacciones triples, sino también ampliar la significancia estadística de las interacciones dobles respecto de cada variable. Pero la mayor utilidad podría consistir en separar los efectos individuales, logrando una mayor comprensión del factor que más contribuye con la remoción del cromo.

2.3.6.2 Análisis de metadiversidad bacteriana.

Los diagramas de barras anteriores (ilustración 26 **a-b-c-d-e**) representan el resumen de la prueba de metadiversidad molecular para bacterias y cuyo propósito fue rastrear los géneros adicionados en el vivero como *Ochrobactrum* y *Bacillus* pero también explorar algunos otros géneros que pudieran estar contribuyendo a la reducción y/o remoción del cromo y que aún no han sido reportados en la literatura (Ver anexo C-2).

El diagrama de barras correspondiente a los géneros bacteriales presentes en las muestras, da cuenta del género *Ochrobactrum*, más no de *Bacillus*. No obstante, como puede apreciarse en el reporte de la caracterización bioquímica bacterial usando el protocolo API (experimento B), se reportan algunas especies de *Bacillus*. Estos datos concuerdan con las cepas de la familia *Bacillaceae* aisladas en suelos contaminados con Cr^{6+} y con los géneros *Bacillus* sp, *Arthrobacter* sp y *B. cereus* aislados por Megharaj, Avudainayagam, & Naidu, (2003). Nótese también en la ilustración 26-**a** del informe de metadiversidad, el orden *Bacillales* reportado y en la ilustración 26-**b** la clase *Bacilli*, presente en al menos 10 de las 12 muestras analizadas, en contenidos variables importantes.

Resulta significativo que sólo *Ochrobactrum* esté presente en el reporte de metadiversidad y por el contrario que el género *Bacillus* no aparezca en las muestras analizadas. Son muchos los investigadores que recientemente han reportado a *Bacillus* spp. como género con potencial para remover cromo (S. Das et al., 2014, Huang et al., 2015, Xu et al., 2009, Bachate, Nandre, Ghatpande, & Kodam, 2013, Mandal, Singh, Jariyal, & Gupta, 2014).

Como se mencionó, los mecanismos propuestos mediante los cuales se llevan a cabo los procesos reducción o remoción del metal a nivel celular son múltiples e inciertos aún, sin embargo, son pocos los autores que dan cuenta de la propiedad de algunos microorganismos para actuar como facultativos y en todo caso es posible que algunos de ellos se comporten como cromotolerantes en ambientes extremos o artificiales, como sería el caso del laboratorio en medios de cultivo y por lo tanto cuando dichos organismos sean de vida libre podrían dejar de ejercer esa facultad. Todo lo contrario podría ocurrir también como se presentó en este ensayo, que en concentraciones bajas (capítulo B), algunos microorganismos no remuevan suficientes cantidades de cromo y en presencia de grandes cantidades puedan ejercer su capacidad buffer o tamponadora de la que algunos autores han hablado, removiendo así o acomplejando cantidades considerables de metales (Shanker et al., 2005).

La rizosfera actúa como un micro ecosistema donde se desarrollan intrincadas interrelaciones microbiales con competencias intra e interespecíficas que podrían ejercer un papel para favorecer o no, alguna especie en particular y éste podría ser el caso de la cepa *Bacillus* aportada al consorcio al momento de diseñar el experimento, la cual pudo haber sufrido un efecto de supresión, en virtud de la competencia presente tanto en el Andisol como en el Inceptisol. Es posible incluso, que el orden *Bacilliales* del que da cuenta la ilustración 26-a, esté contribuyendo con otras especies diferentes a la inoculada, (*Bacillus*) y que tampoco aparezcan reflejadas en la ilustración 26-e donde se detallan los géneros presentes.

Se sabe que las raíces de las plantas tienen la capacidad de transformar el medio en el cual crecen. Ellas pueden desarrollar diferentes estrategias para sobreponerse a condiciones adversas, como deficiencia o exceso de iones, condiciones de sequía, exceso de humedad o de sales, que les permiten la sobrevivencia y su evolución. Son conocidos también mecanismos que inducen cambios en la concentración iónica de los elementos nutricionales en la rizosfera, en las condiciones redox, en el pH y en la complejación de metales a nivel rizosférico. Todos o algunos de estos mecanismos pudieron actuar para que se llevase a cabo la importante acción reductora/removedora que se logró con adiciones de 2400 ppm de cromo en algunas macetas, en las que se presentaron remociones de Cr^{6+} superiores al 99% en Andisoles y cercanas al 90 % en Inceptisoles.

Otras estrategias incluyen la liberación de exudados (enzimas, ácidos orgánicos, mucílagos) con importante influencia en la CIC rizosférica y/o en la unión de algunos iones metálicos como Cu y Zn. El suelo de la rizosfera contiene mayor cantidad de microorganismos que el resto del volumen del suelo, por lo cual se puede establecer un efecto rizosférico para cada planta, que varía según genotipo, especie y ecotopo. Es posible entonces que un ambiente en el que prospera una leguminosa, se favorezca mucho más el género *Rhizobium*. Esto podría explicar la ausencia del género *Bacillus* en los resultados de metadiversidad bacteriana de este ensayo, en presencia de frijol arbustivo *P. vulgaris*, después de haber sido inoculado.

El aspecto más revelador de esta prueba de metadiversidad a nivel de género, se refleja en la figura 26-e, en la cual se incluyen géneros como *Masillia*, *Burkholderia*, *Myroides*, *Terrabacter*, *Lysobacter*, *Devosia*, *Phingomonas*, además de los ya mencionados *Ochrobactrum* y *Bacillus*. Lo anterior abre un horizonte insospechado en el tema de la biorremediación de metales traza con posible énfasis en cromo, ya que no se sabe cual fue el aporte con que cada género de estos pudiera haber contribuido a la remoción total del cromo cuando fueron agregadas cantidades de 2400 ppm de éste metal. Es posible que muchos de ellos no puedan ser cultivados aún en laboratorio, pero en todo caso, si algunos resultasen ser microbiota nativa de Andisoles o Inceptisoles podrían llegar a contribuir iluminando un campo oscuro, como es el de la gestión para la aplicación adecuada de biosólidos y la tasa agronómica que deba considerarse en virtud de la zona de vida o ecosistema donde vayan a ser dispuestos una vez salgan de la PTAR.

Por otra parte, los géneros de que da cuenta la ilustración 26-e, podrían contribuir también a

enriquecer el estado del arte en materia de microbiota cromotolerante o con potencial biotecnológico de remediación, ya que al no estar reportados, no sólo se constituyen en un filón o veta de carácter global para la detoxificación, sino también, que sería necesario hacer lo pertinente para confirmar si algunos de los géneros hallados, podrían ser organismos indígenas no reportados en Colombia.

2.3.7. CONCLUSIÓN

Altas dosis de Cr^{6+} en Andisoles e Inceptisoles, del orden de 2500 mg kg^{-1} podrían ser removidas en condiciones de invernadero por microorganismos que sólo toleran dosis bajas (600 mg kg^{-1}) o medias (1200 mg kg^{-1}) en el laboratorio. Estos microorganismos podrían actuar de manera sinérgica con otras especies presentes en los suelos o asociados a la rizosfera del frijol.

2.4. Capítulo D

Neutralización del cromo en el suelo mediante el uso del Silicato de Magnesio.

2.4.1. RESUMEN

Las alternativas de bioremediación exploradas en ésta tesis doctoral han mostrado hasta el presente ensayo que algunos microorganismos tienen la capacidad de reducir y/o remover cromo de ambientes contaminados con este metal. No obstante los porcentajes de remoción por parte de dichos microorganismos fluctúan en rangos amplios de eficiencia.

Con el objeto de explorar nuevas alternativas que puedan coadyuvar en éste propósito, se realizó una incubación consistente en tratar los biosólidos de la PTAR San Fernando con una enmienda mineral, rica en silicato de magnesio del 40 % para observar el efecto de adsorción o reacción de intercambio catiónico que dicha enmienda podría ejercer sobre el cromo presente en los biosólidos y convertir éste metal a formas no biodisponibles y menos lábiles en ambientes que lo contengan. Se consiguió neutralizar el 100 % del cromo a partir de adiciones de 1 g de silicato de magnesio por cada 100 g de biosólidos.

2.4.2. ESTADO DEL ARTE

La cinética y reacciones químicas de las diferentes especies de cromo en el suelo son aún bastante desconocidas (Avudainayagam et al., 2003). Algunos investigadores han señalado que puede darse la oxidación disminuida de cromo por la vía química con el uso de Antraquinona-2,6-disulfonato, AQDS (Brose & James, 2008b).

Bishop y colaboradores, demostraron que el Fe^{2+} estructural en ambientes químicamente reducidos ricos en minerales arcillosos tiene la habilidad natural para reducir Cr^{6+} a Cr^{3+} como una forma de inmovilización y detoxificación. Los autores evaluaron tres tipos de arcilla, nontronita, montmorillonita y clorita, a tres temperaturas diferentes, 10, 20 y 30°C para la reducción de Cr^{6+} en ambiente acuoso al reaccionar con Fe^{2+} . Nontronita y montmorillonita mostraron buena reducción a las tres temperaturas, clorita no fue reactiva hacia Cr^{6+} a 10°C aunque a 30°C se presentó algo de reducción (Bishop, Glasser, Dong, Arey, & Kovarik, 2014).

En aguas residuales, el Cr^{6+} se encuentra en solución como CrO_4^{2-} y puede removérsele por reducción, por precipitación química, por adsorción o por intercambio iónico, entre otros (Cárdenas-González et al., 2011).

Stein & Schwedt (1994) demostraron que hasta el 46 % del cromo presente en aguas residuales puede ser fijado a partículas macromoleculares y el 25 % adsorbido a la fracción coloidal en forma de complejos muy estables; pero una fracción del cromo total puede mantenerse en forma iónica y podría migrar de una valencia a otra.

Recientemente Akram y colaboradores (2017) emplearon biocompuestos a base de *Manguifera indica* para observar la adsorción y desorción de Cr^{6+} . Mediante el empleo de isotermas de adsorción determinaron los niveles óptimos de pH, dosis adsorbente, tiempo de contacto, concentración de iones de cromo y temperatura (Akram, Bhatti, Iqbal, Noreen, & Sadaf, 2017).

Yang y otros (2013) emplearon isotermas de adsorción y pruebas SEM al microscopio electrónico de barrido para evaluar la adsorción de níquel y cobalto utilizando diferentes dosis de silicato de magnesio y determinaron que la máxima capacidad de remoción se logró a un pH de 5 con un equilibrio de adsorción en corto tiempo (Yang & Wang, 2013).

Silicato de magnesio fue empleado en pruebas de adsorción de plomo y bisfenol de manera individual y

simultánea. Como adsorbente se usó carbón activado, recubierto de aceite de palma e impregnado en silicato de magnesio, logrando una adsorción de 419.9 mg g^{-1} de plomo y concluyeron que éste sorbente tiene un alto potencial en el tratamiento de aguas residuales que contienen metales pesados tóxicos, debido a su capacidad de sorción (Choong, Ibrahim, Yoon, & Jang, 2018).

Investigadores de la Universidad Politécnica de Budapest, Rumania, evaluaron la arcilla roja, un subproducto de la industria metalúrgica del aluminio, por su capacidad de intercambio catiónico para inmovilizar cromo, la cual fue determinada en 61 mg g^{-1} de arcilla roja y confirmaron que dicha capacidad de intercambio sólo puede darse cuando el efluente residual, rico en aguas cromadas, contiene cantidades que no superen ésta capacidad (Niculescu, Dana Ionita, & Filipescu, 2010).

La biomasa microbiana puede ser inmovilizada en un amplio rango de materiales inertes como sílica, poliacrilamida, polimetano y polisulfona que han sido usados en variedad de bioreactores (Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez, 2016).

2.4.3. OBJETIVOS

- Evaluar la enmienda mineral *Magnesil* como elemento secuestrante del cromo en el suelo.
- Contrastar la capacidad de inmovilización del cromo por efecto del silicato de magnesio en un Andisol y un Inceptisol

2.4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

- UBICACIÓN

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de suelos de propiedad de la empresa *Mejisulfatos-Agrosilicium* ubicada en la ciudad de Itagüí- Antioquia

- METODOLOGÍA

Se realizó una incubación consistente en una mezcla de silicato de magnesio proveniente de Serpentina y biosólido de 93 ppm de cromo total, en dosis crecientes de silicato de magnesio (0; 0.5 ;1.0; 2.5; 5; 10; 30; 50 y 100 g) por una dosis única de 50 gramos de biosólido p/p. Un blanco fue instalado para advertir interferencias por contaminación de reactivos. El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 30 días. Se mantuvo cubierto con lonas de polipropileno y con humedad permanente a capacidad de campo al cabo de los cuales se tomaron muestras de 1 g y se le adicionaron 5 mL de ácido clorhídrico sometidas a una digestión durante 45 min a 100°C . Las muestras frías fueron aforadas en balones volumétricos con agua ionizada; los datos fueron leídos en un espectrofotómetro de plasma óptico ICP de tipo Perkin Elmer elaborando una curva de linealidad con los niveles óptimos para la calibración de cada metal.

Por fuera de los objetivos de este trabajo, se concertó con la empresa *Agrosilicium*, buscando hacer más eficiente el montaje del experimento, evaluar la acción del silicato de magnesio sobre los metales arsénico, cadmio, níquel y plomo, de interés para la compañía, lo cual permitiría también contrastes con los resultados hallados para el cromo (Ilustración 27).

- ANÁLISIS DE DATOS

Los tratamientos correspondieron a 8 dosis de silicato de magnesio descritas en la metodología y un blanco sin magnesio; incubados sobre una única dosis de 50 gramos de biosólido p/p con tres replicaciones por tratamiento. Los resultados fueron sometidos a una prueba de varianza procesadas en el Programa R 5.3.1.

2.4.5. RESULTADOS

Tabla 29. Neutralización de algunos metales pesados por efecto del silicato de magnesio adicionado al biosólido. Determinación por Emisión atómica.

Gramos de Magnesil	As ppm		Cd ppm		Cr ppm		Ni ppm		Pb ppm	
0	0,093	a	0,33	a	0,02	a	2,113	ab	0,162	a
0,5	0,060	ab	0,00	b	0,01	ab	2,192	ab	0,03	ab
1	0,053	ab	0,00	b	0,01	ab	2,103	ab	0,00	c
2,5	0,013	ab	0,00	b	0,00	c	2,821	a	0,006	b
5	0,000	bc	0,00	b	0,00	c	3,68	a	0,0001	bc
10	0,000	bc	0,00	b	0,00	c	2,437	a	0,0001	bc
30	0,000	cd	0,00	b	0,00	c	2,713	ab	0,0003	bc
50	0,000	cd	0,00	b	0,00	c	2,409	ab	0,0016	b
100	0,000	d	0,00	b	0,00	c	1,102	b	0,00	c

Letras iguales representan ausencia de diferencia estadística entre tratamientos.

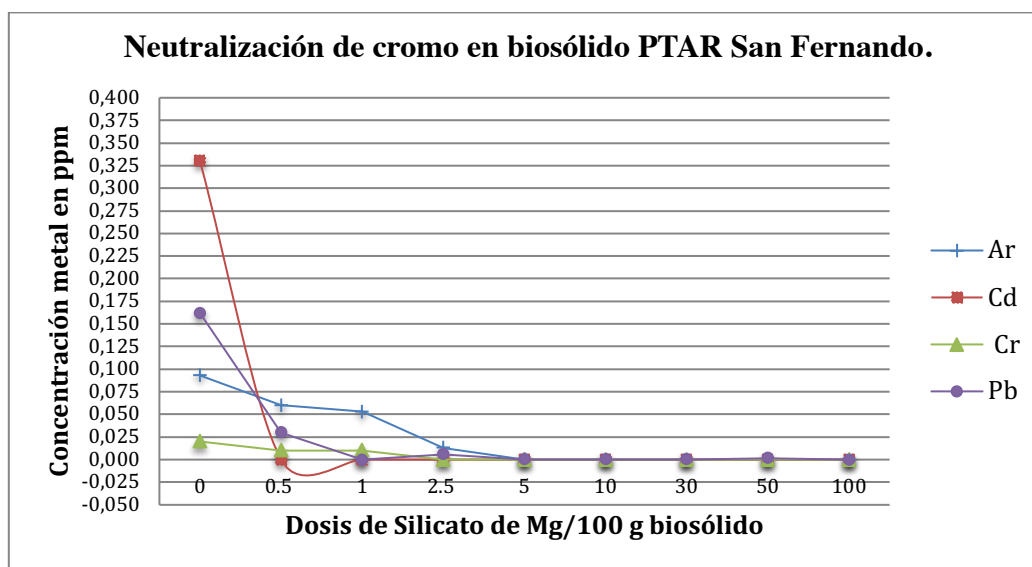


Ilustración 27. Efecto del silicato de magnesio sobre la adsorción de algunos metales (arsénico, cadmio, cromo y plomo) presentes en el biosólido de la PTAR San Fernando.

2.4.6. DISCUSIÓN

Con esta incubación se pretendió lograr un efecto de supresión de la rizosfera y de los microorganismos asociados a ella, aislando por completo los complejos mecanismos rizosféricos que intervienen en la detoxificación del cromo cuando éste entra en contacto con la biota del suelo. Podría afirmarse entonces que la neutralización de este metal, que se consiguió a partir 0,5 g de silicato de magnesio por 100 g de biosólido, se debe en este caso al poder acomplejante del silicato de magnesio a través del ácido ortosilícico.

Por otro lado, es conocido que cuando una planta es expuesta a más de un metal pesado, pueden ocurrir interacciones entre los mismos, tanto en la superficie de la raíz, afectando su absorción, como dentro de la planta alterando su translocación y generando toxicidad (Pahlsson, 1989).

La pared celular de las plantas constituye la primera barrera que cualquier molécula debe superar para llegar al interior de la célula. Ésta, aunque de composición diferente, es muy similar en la gran mayoría de especies y se caracteriza por una alta cantidad de cargas negativas, lo que determina una gran afinidad por los cationes. Suprimir el efecto de la posible acción de la rizosfera y los microorganismos asociados a ella, permite afirmar que la neutralización del cromo presente en el biosólido, reduciendo la fracción lábil y haciéndolo no biodisponible, se debe a un intercambio iónico con los cationes presentes en el suelo permitiendo que se favorezca la reacción química.

Algunos organismos inclusive, cuando prosperan en ambientes con exceso de metales pesados, tienen la capacidad de cambiar la composición de su pared celular, para que ésta pueda absorber mayor cantidad de ellos, tal como sucede en el caso de las micorrizas ericoides en presencia de altas cantidades de zinc. En este experimento, fue suprimida también la acción remediadora de los microorganismos, lo cual permite afirmar que el secuestro del cromo en el suelo se debe al intercambio catiónico que tiene lugar en el biosólido como respuesta a la acción del silicato.

Aún son inciertos los diferentes mecanismos que podrían intervenir para la neutralización del cromo en el suelo o en una matriz de biosólido. Se postula que el ácido orto-silícico H_4SiO_4 hace una reacción química por sustitución de hidrógenos con cualquier catión del suelo, formando un “metal-silicato”, en este caso con el metal en estudio se formaría un cromosilicato, pero también podría ser un aluminosilicato o algún otro catión de alta disponibilidad en el suelo.

La principal característica de estos silicatos es que son 100 % insolubles y en consecuencia precipitan tornándose no biodisponibles dentro de la solución del suelo o permitiendo su recuperación si se hace en un ambiente acuoso que posibilite su captura. Se sabe que los quelantes minerales son más fuertes y estables que los orgánicos, ya que estos últimos muchas veces forman enlaces débiles por cargas magnéticas o electromagnéticas, que en virtud de su fuerza de atracción podrían liberar el metal en cualquier momento permitiendo que nuevamente se haga biodisponible. No ocurre lo mismo con el quelante mineral, en el que se da es una reacción de intercambio químico, de alta estabilidad y difícil de hacerse reversible. Finalmente, otro factor que se postula, y sobre los que realmente se conoce muy poco y que motivaron la exploración llevada a cabo en este capítulo, es que en algunas condiciones con posterior a aplicación del correctivo, se puede llegar a formar ácido poli-silícico, cuya característica es que genera un ambiente que gana humedad del medio y se convierte en altamente reductor.

Resulta interesante observar como puede esta situación afectar el crecimiento de una planta y si efectivamente, el silicato de magnesio actúa como correctivo para impedir que el cromo se haga biodisponible y permanezca secuestrado en el suelo. Hasta el presente no se tienen reportes de investigaciones que den cuenta de ello. Tampoco ha sido muy explorada la sinergia entre microorganismos remediadores en acción combinada con métodos químicos pueda favorecer el desarrollo de las plantas. En esta dirección fue orientado el siguiente experimento concluyendo que el silicato de magnesio puede ser utilizado en programas de remediación de cromo tanto en la fuente como *in-situ*, solo o en combinación con métodos biológicos.

Este tipo de opciones permitiría explorar sustratos a base de silicio para algunos complejos microbianos susceptibles de ser utilizados en bioremediación que puedan beneficiarse a la postre de este material para potencializar su acción

2.4.7. CONCLUSIÓN

El silicato de magnesio proveniente de rocas ultramáficas como la serpentina, tiene un alto poder secuestrante del cromo presente en el biosólido a través de las reacciones químicas que forma el ácido ortosilícico con los cationes libres, acelerando la precipitación del metal o reteniéndolo en la fracción coloidal del suelo en formas no biodisponibles para plantas, animales, microorganismos, impidiendo así su magnificación en la cadena trófica.

2.5. Capítulo E

Neutralización de cromo en el suelo por la acción combinada de microorganismos y Silicato de Magnesio.

2.5.1. RESUMEN

Se llevaron a cabo tres biotests usando Rhizotrones prototipo desarrollados por el grupo de investigación *Sistemas Simbióticos* del Laboratorio de Micología y Biotecnología Ambiental del Suelo de la Universidad Nacional en Medellín.

Los Rhizotrones se constituyen en una buena alternativa para llevar a cabo biotest de toxicidad, pues permiten no sólo la observación directa en tiempo real del crecimiento de la raíz por medio de una cámara web que detecta y registra los cambios en el crecimiento radical, sino que, un registro secuencial fotográfico, permite la consolidación de cientos de imágenes hasta convertirlas en una película, que puede modelarse matemáticamente para demostrar cualquier cambio inducido o promovido por alguno de los tratamientos.

Ésta herramienta, de tipo pantalla plana, permite también comparaciones instantáneas en muy corto tiempo, bastante elocuentes, como respuesta por ejemplo a suelos de texturas diferentes o cualquier variable que se quiera investigar y que repercuta o se traduzca en cambios morfológicos. En este experimento, se compararon un suelo de tipo Andisol contra un Inceptisol en los cuales se contrastó inicialmente la lechuga (*Láctica sativa*) como biondicador y posteriormente Lenteja (*L. culinaris*) en presencia de silicato de Magnesio, biosólido, cromo y microorganismos con capacidad para remover éste metal.

Cada experimento tuvo una duración de seis días. La dosis de cromo a evaluar fue elegida a través de biotest de toxicidad previos en lechuga (ver anexo E-1), las variables evaluadas fueron, la altura de la planta y longitud de la raíz, con las cuales se corrió una prueba de multivarianza en el programa R. El ANOVA confirma una diferencia estadística significativa entre los tratamientos que no tuvieron cromo y los que tenían presencia del metal. En la prueba de remediación que combina medios químicos y biológicos para remover el cromo adicionado, el análisis de varianzas no reporta significancia estadística para la variable altura de la planta mas si para la variable longitud de la raíz.

2.5.2. ESTADO DEL ARTE

El interés por poder apreciar en detalle el crecimiento de las raíces de las plantas y hacer un seguimiento de ellas, se remonta a varios años atrás (McDougall, 1916). Con el progreso de las técnicas de laboratorio y el avance en las telecomunicaciones, hoy se tienen diferentes alternativas para explorar el sistema radical de cualquier vegetal.

El Rhizotron es un dispositivo muy útil para ello y de manera permanente se proponen nuevos modelos y ajustes que brindan cada vez mayor precisión. Entre sus múltiples ventajas se cuenta el poder llevar a cabo aspectos morfométricos no invasivos ni destructivos (Busch, Mendelssohn, Lorenzen, Brix, & Miao, 2006), diseñar unidades experimentales independientes y específicas, posibilidad de diseño artesanal a bajos costos y versatilidad para montar y desmontar pruebas en corto tiempo, con resultados tangibles y evidentes que complementan bien el soporte estadístico y pueden documentarse con fotos o películas en tiempo real.

El Rhizotron permite además explorar raíces tanto en condiciones normales como en suelos anegados (Busch et al., 2006) y puede ser una herramienta útil para evaluar biosensores, o bioindicadores en ambientes húmedos o secos. En 1997, en Cornwall, Ontario se creó la red Water Tox que aprobó los siguientes bioindicadores para diferentes ambientes (Castillo, 2004)

- Semillas de lechuga (*L. sativa* L.): evaluación inhibición germinación (120 h), e inhibición en elongación de radícula e hipocótilo.
- Bulbos de cebolla (*Allium cepa*): evaluación inhibición en crecimiento de raíces (72 h).
- *Daphnia magna*: porcentaje de mortalidad (48 h).
- *Hydra attenuata*: cambios morfológicos-efectos letales y subletales (96 h).
- *Panagrellus redivivus* (Nemátodo) : prueba de 96 h de maduración.
- *Salmonella typhimurium* sin activación S-9 : (96 h, 96 micropozos)

Los bioindicadores deben tener talla pequeña, gran sensibilidad a sustancias tóxicas, ciclo de vida corto, bajos requerimientos nutricionales, demanda de poco espacio en el laboratorio y poca necesidad de agua para su multiplicación, lo cual los hace ideales para estudios de bioacumulación (Hassan et al., 2012), (Reish y Oshida 1987).

Cada etapa de la autodepuración en un cuerpo de agua o de suelo que ha sufrido la descarga de algún contaminante se caracteriza por la presencia de determinados indicadores. Según su sensibilidad a la polución, éstas especies se clasifican en intolerantes, tolerantes, o facultativas (Duarte et al., 2012, Silva, Torrejón, Bay-Schmith, & Larrain, 2003). Estos indicadores son:

- Concentración más alta del tóxico a la cual no se observa efecto (NOEC).
- Concentración más baja a la que se observa efecto (LOEC).
- Concentración efectiva (CE) que causa un efecto adverso observable mediante una respuesta discreta en un porcentaje dado de organismos.
- Concentración letal (CL) que causa la muerte a un determinado porcentaje de la población
- Concentración inhibitoria (CI) del tóxico, muestra o efluente que puede producir un efecto biodepresivo o cambio en una respuesta biológica de la población evaluada.

Teniendo en cuenta algunos de estos principios y con base en los bioindicadores aceptados internacionalmente se decidió explorar el Rhizotron conjuntamente con el bioindicador constituido por semillas de Lechuga, para acometer este experimento y validar los géneros microbianos más promisorios de los ensayos precedentes, en combinación con métodos químicos mediante la utilización de Silicato de Magnesio.

Algunos investigadores han evaluado la combinación de métodos biológicos y fisicoquímicos en la remoción de cromo de aguas residuales en la industria curtiembre con el objetivo de reciclar Cr^{3+} y eliminar biológicamente el Cr^{6+} (Ahmed, Abdulla, Mohamed, & El-Bassuony, 2016). Éstos autores utilizaron cal y polvo de cemento para precipitar el Cr^{3+} logrando una recuperación del 98 % usando 2 g/100 mL de cal y 2 h de sedimentación, así mismo lograron una bioeliminación del 99 % Cr^{6+} en columnas de microcosmos con arena inoculada con el actinomiceto *Kitasatosporia* sp. (OD600: 2.43) y una velocidad de flujo de 2 mL min⁻¹. Los cueros tratados con el cromo reciclado, mostraron propiedades similares a los tratados con cromo comercial.

2.5.3. OBJETIVOS

- Confirmar la capacidad de remoción de Cr^{6+} de *Ochrobactrum anthropi* y *Trichoderma* sp. y *Scedosporium dehoogii* y *Bacillus cereus*, actuando en tándem o en consorcio, en un Andisol e Inceptisol adicionados con cromo hexavalente.

- Evaluar la capacidad sinérgica del silicato de magnesio para neutralizar Cr^{6+} en suelos contrastantes Andisol e Inceptisol coadyuvados por el consorcio microbial conformado por *Ochrobactrum anthropi*, *Bacillus cereus*, *Scedosporium dehoogii* y *Trichoderma* sp.

2.5.4. METODOLOGÍA

- SITIO EXPERIMENTAL

El ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de Micología y Microbiología Ambiental del Suelo de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín que coordina el profesor Juan Carlos Pérez; Latitud: $6^{\circ} 15' \text{ N}$, Longitud $75^{\circ} 35' \text{ W}$, Altitud: 1495 m, Precipitación: 1650 mm año^{-1} , Temperatura : 21°C , Brillo solar: 1800 h año^{-1} .

- MEDIO DE CULTIVO Y TRATAMIENTOS

Se refinaron prototipos de Rhizotrones contruidos al interior del grupo de investigación *Sistemas Simbióticos* de la Universidad Nacional de Colombia, Medellín. Éstos consistieron en placas de vidrio de 4 mm de espesor, separadas por un tabique central de acrílico, formando dos compartimientos; sus medidas fueron $13 \times 11 \times 2 \text{ cms}$ para cada uno. En uno de los compartimientos se dispuso suelo de tipo Andisol previamente caracterizado, disturbado, secado y tamizado a 20 micras y un segundo compartimiento, fue ocupado con suelo Inceptisol tratado de igual forma.



Ilustración 28. Modelo de Rhizotron de un solo cuerpo y detalle de la siembra.

Ambos suelos fueron enriquecidos con dicromato de potasio como fuente de cromo hexavalente a una concentración de 50 ppm partiendo de una solución madre de 1000 ppm de dicromato de potasio, diluida serialmente a 300 ppm y ajustada según el volumen de suelo contenido en los Rhizotrones así:

Tabla 30. Peso del suelo y volumen de solución de dicromato de potasio como fuente de Cr^{6+} usado en cada uno de los Rhizotrones.

Rhizotron	Peso (g) Andisol	V (mL) Cr (300 ppm)	peso(g) Inceptisol	V (mL) Cr (300 ppm)
Rhizotron 1	70	11.7	130	21.83
Rhizotron 2	72	12	137	22.83
Rhizotron 3	75	12.5	131	21.83
Rhizotron 4	75	12.5	133	22.17

- ENSAYO No 1.

Tratamiento 1: Andisol (S1) e Inceptisol (S2) como testigos,

Tratamiento 2: Andisol (S1) e Inceptisol (S2) + *Ochrobactrum* + *Trichoderma*

Tratamiento 3: Andisol (S1) e Inceptisol (S2) + 50 ppm Cr^{6+}

Tratamiento 4: Andisol (S1) e Inceptisol (S2) + 50 ppm Cr^{6+} + *Ochrobactrum* + *Trichoderma*.

- ENSAYO No 2.

Tratamiento 1: Andisol (S1) e Inceptisol (S2) + 50 ppm Cr^{6+}

Tratamiento 2: Andisol (S1) e Inceptisol (S2) + 50 ppm Cr^{6+} + Silicato de Magnesio

Tratamiento 3: Andisol (S1) e Inceptisol (S2) + 50 ppm Cr^{6+} + Consorcio Microbiano (CM) (*)

Tratamiento 4: Andisol (S1) e Inceptisol (S2) + 50 ppm Cr^{6+} + C M+ Silicato de Mg

- ENSAYO No 3.

Tratamiento 1: Andisol (S1) e Inceptisol (S2) + Biosólido 20 ton ha^{-1}

Tratamiento 2: Andisol (S1) e Inceptisol (S2) + Biosólido 20 ton ha^{-1} + C M (*)

Tratamiento 3: (S1) y (S2) + Biosólido 20 ton ha^{-1} + C M + Silicato de Mg

Tratamiento 4: (S1) y (S2) + Biosólido 20 ton ha^{-1} + C M) + Silicato de Mg +50 ppm Cr^{6+} .

(*) *Ochrobactrum anthropi* + *Bacillus cereus* y *Scedosporium dehoogii* + *Trichoderma* sp..

Una cámara web (Microsoft HD 3000) fue instalada al interior de cada caja portadora de Rhizotrones, para hacer fotografías cada 15 minutos durante 120 horas por cada experimento realizado, al cabo de las cuales podía leerse la película que daba cuenta del crecimiento radical. Las imágenes fueron colectadas, almacenadas y procesadas en el software MedusaRhizo (versión demo) construido en el laboratorio por el grupo *Sistemas Simbióticos*, con algoritmos diseñados y elaborados por el estudiante Daniel Pineda.

Los Rhizotrones fueron acoplados en cajas de madera tipo Triplex® de 4 mm, pintadas al interior con vinilo negro para evitar el reflejo de la luz, acondicionado con una guía interior para contener el Rhizotron haciendo un ángulo de 37 grados de tal forma que las raíces pudieran crecer pegadas al vidrio y facilitar el monitoreo de su crecimiento. Como planta bioindicadora, fue elegida inicialmente la lechuga *L. sativa* (protocolo Water Tox - Ontario) y posteriormente se cambió a lenteja *L. culinaris*, por considerarse de mayor rusticidad y más fácil manipulación, elegida con los mismos criterios del protocolo mencionado para bioindicadores.

- OBTENCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Los microorganismos fueron obtenidos mediante los experimento B, C y D detallados aquí, seleccionando un tándem conformado por un hongo y una bacteria de comportamientos consistentes evaluados en el capítulo B, por su facultad para crecer en medios enriquecidos con cromo y su capacidad de remoción de la especie

hexavalente. Se seleccionaron entonces *Ochrobactrum anthropi* y *Trichoderma* sp., para el primer ensayo; para el segundo ensayo se replicó dicho tándem adicionado con el tándem *Scedosporium dehoogii* y *Bacillus ceureus*.

La solución de microorganismos fue obtenida suspendiendo los cultivos en agua destilada esterilizada. Para las bacterias la concentración fue de $1,5 \times 10^9$ células en 20 mL, con base en la escala McFarland N° 5; se adicionaron 2 mL de suspensión bacteriana a cada tratamiento.

- ANÁLISIS DE LOS DATOS

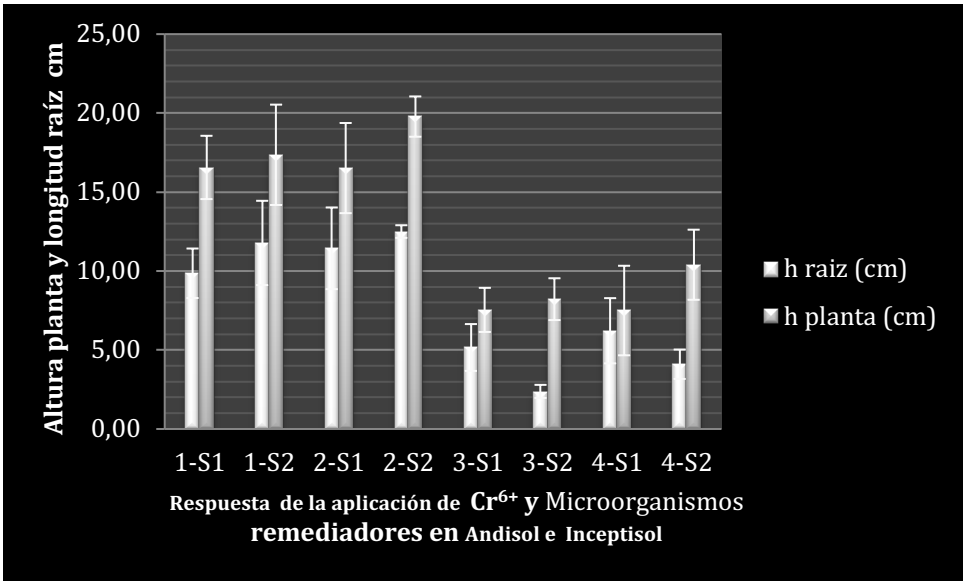
Las variables altura de la planta y longitud de la raíz fueron sometidas a un ANOVA corrido en R-core team (2017); y una prueba de Normalidad de residuales siguiendo el test Shapiro y prueba de homogeneidad de varianzas en el test Levene.

2.5.5. RESULTADOS

Tabla 31. Ensayo No.1 Desviación estándar y promedios de crecimiento de raíz y altura de *L. culinaris*, en presencia de Cr⁶⁺ y los microorganismos *Ochrobactrum anthropi* y *Trichoderma* sp.

Tratamiento	Longitud raíz (cm)	Desvi. Estándar	Altura planta (cm)	Desvi. Estándar
1-S1	9,86	1,57	16,56	2,00
1-S2	11,78	2,67	17,36	3,18
2-S1	11,44	2,59	16,52	2,85
2-S2	12,50	0,40	19,78	1,28
3-S1	5,16	1,48	7,54	1,40
3-S2	2,38	0,41	8,22	1,32
4-S1	6,22	2,06	7,50	2,83
4-S2	4,10	0,93	10,40	2,22

Si= Andisol. S2= Inceptisol



Si= Andisol. S2= Inceptisol

Ilustración 29. Ensayo No.1 Crecimiento de raíz y altura de *L. culinaris*, en presencia de Cr⁶⁺ y los microorganismos *Ochrobactrum anthropi* y *Trichoderma* sp.

Los tratamientos 3 y 4 del ensayo No. 1 que recibieron 50 ppm de Cr⁶⁺ en comparación con los tratamientos 1 y 2 que crecieron libres de cromo, presentan una diferencia estadísticamente significativa manifestada por un pobre crecimiento de raíz. Ensayos previos llevados a cabo en el laboratorio, con pruebas de germinación de lechuga (*L. sativa*) creciendo en cajas Petri inicialmente y luego en potes de 100 g de capacidad, en dosis desde 50 hasta 250 ppm, mostraron daño en la radícula a nivel del hipocótilo, manifestado por necrosis del tejido meristemático a todas las dosis, sin supresión de la dominancia apical, pero con una detención importante y evidente del crecimiento pivotante. (Anexo No. E-1).

El análisis estadístico para la variable longitud de la raíz refleja que no existe diferencia estadística entre ninguno de los tratamientos obrando sobre Andisol e Inceptisol con valores $Pr(>F)$ 0.18412 ; 0.33959 ; 0.06417; 0.18412 para los tratamientos 1, 2, 3 y 4 respectivamente. En cambio, cuando la comparación es entre parejas de tratamientos, se aprecia una diferencia significativa entre 1-3 y 1-4 ; 2-3 y 2-4 para el caso de Andisol, que se repite en Inceptisol entre 1-3 y 1-4 ; 2-3 y 2-4, aunque con magnitudes bastante diferentes entre Andisol e Inceptisol corroborando la marcada detención del crecimiento en los tratamientos con presencia de cromo.

En consecuencia como se mencionó, existe significancia estadística para los tratamientos que recibieron 50 ppm de Cr^{6+} con respecto a los que no recibieron, pero no hay diferencia estadística entre tratamientos 3 y 4 ni en Andisol ni en Inceptisol (Anexo E-2).

La ilustración 29 muestra que es mucho más severo el deterioro del crecimiento en Andisol que en Inceptisol, tanto en raíz, como en altura de la planta. Esto podría sugerir un menor impacto del cromo a favor del Inceptisol, lo cual estaría en contra de lo esperado en virtud de los tenores de materia orgánica y de la textura diferente entre los dos suelos que permitiría esperar un mejor comportamiento agronómico en Andisol y mayor capacidad de amortiguación del cromo adicionado. Nótese además, que aunque no se alcanza la significancia estadística entre los tratamientos 3 y 4, la ilustración 29 permite ver que es notable la diferencia entre tratamientos a favor del tratamiento 4 que contiene los microorganismos, lo cual permitiría pensar que podría haberse iniciado una restauración del crecimiento, cercana al momento del desmonte del experimento. Lo anterior estaría por confirmarse, mediante los análisis de la película lograda para tal fin. Tiempos de residencia más largos podrían también confirmar esta hipótesis.

La variable altura de la planta se comportó de igual forma, con diferencia estadística significativa entre 1-3 y 1-4 para ambos suelos, pero sin diferencia entre los tratamientos 3 y 4 sugiriendo la mencionada acción restauradora del crecimiento en el tratamiento 4 que recibió cromo, pero también tuvo microorganismos

Tabla 32 Ensayo No.2 Desviación estándar y promedios de crecimiento de raíz y altura de *L. culinaris* en presencia de Cr^{6+} , silicato de magnesio y los microorganismos *Ochrobactrum anthropi*, *Bacillus cereus*, *Scedosporium dehoogii* y *Trichoderma* sp.

Tratamiento	Longitud raíz (cm)	Desvi. Estándar	Altura planta (cm)	Desvi. Estándar
1-S1	10,68	2,11	13,38	6,06
1-S2	4,20	1,45	9,26	2,26
2-S1	14,32	0,47	14,88	2,69
2-S2	2,12	0,84	12,72	5,18
3-S1	11,54	2,56	19,30	5,42
3-S2	5,36	0,58	13,38	4,11
4-S1	13,23	0,74	20,12	4,85
4-S2	3,15	0,66	13,33	3,91

Si= Andisol. S2= Inceptisol

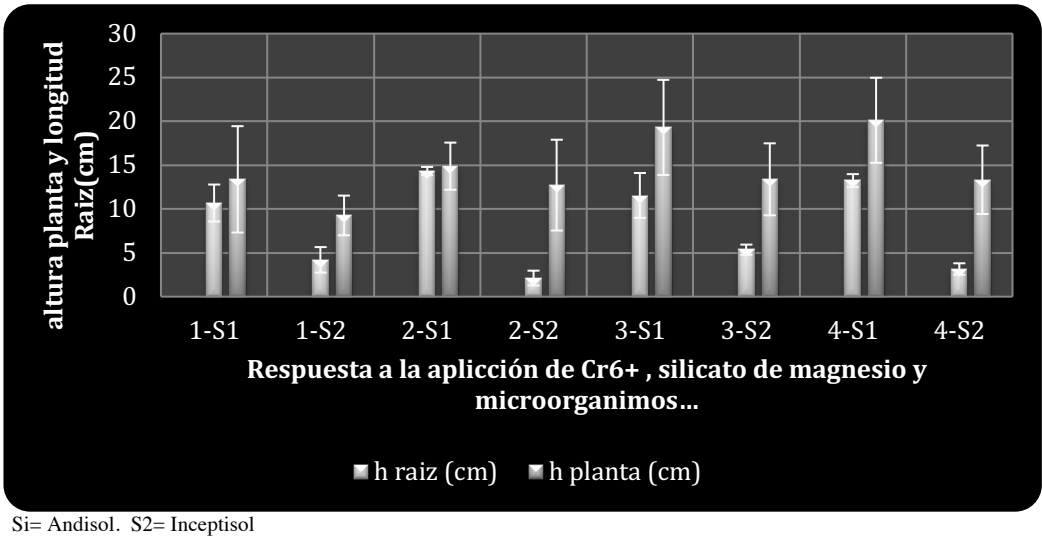


Ilustración 30. Ensayo No.2 Efecto del Cr ⁶⁺ en el crecimiento de *L. culinaris*, en suelos de tipo Andisol e Inceptisol en presencia de silicato de Mg y los microorganismos *Ochrobactrum anthropi*, *Bacillus cereus* , *Scedosporium dehoogii* y *Trichoderma sp* .

La tabla 32 refleja la diferencia que permite comparar las medias para la longitud de la raíz, entre los dos suelos con marcada la diferencia a favor del Andisol. La altura de la planta en cambio, no refleja la misma situación y las diferencias no son tan evidentes. La Ilustración 30 permite confirmar gráficamente lo anterior y la prueba estadística lo ratifica mostrando una diferencia altamente significativa para el factor suelo.

Para esta prueba se recurrió a nuevas muestras de suelos Andisol e Inceptisol, previamente caracterizadas. El reporte estadístico muestra que hay diferencia para suelo y para la interacción suelo * tratamiento, más no para tratamientos, cuando se analiza la longitud de la raíz. Lo anterior permitiría pensar que hay un peso específico para cada factor, (diseñado para mitigar el efecto del cromo sobre la planta) difícil de separar y que tanto la textura, como el silicato de magnesio como el consorcio microbial, afectan el desarrollo de la raíz pero se desconoce en que proporción lo hacen o respecto de cada cual afectan la elongación de la raíz. En cambio en la variable altura, se presenta una significancia estadística para el factor suelo y también para tratamientos, más no para la interacción suelo*tratamiento.

Azmat y colaborador, (2005) evaluaron el crecimiento de un tipo de frijol *Vigna radiata* y confirmaron que el cromo limita mucho más el crecimiento de la raíz que el crecimiento de las hojas y que la presencia de cromo en la raíz limitó la absorción y traslocación al interior de la planta de otros cationes como el potasio, calcio, magnesio, manganeso, hierro, además del fósforo (Azmat & Khanum, 2005).

Tratamiento 1



- * Inceptisol (I) vs. Andisol(D)
- * 50 ppp Cromo a cada suelo

Tratamiento 2



- Inceptisol (I) vs. Andisol(D)
- 50 ppp Cromo a cada suelo
- Silicato de Magnesio así:
 - Andisol: 0,52 g.Kg⁻¹
 - Inceptisol: 1.04 g.Kg⁻¹

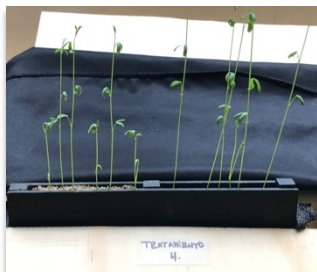
Tratamiento 3



- Inceptisol (I) vs. Andisol(D)
- 50 ppp Cromo a cada suelo
- Ochrobactrum + Trichoderma+ Scedosporium+ Bacillus

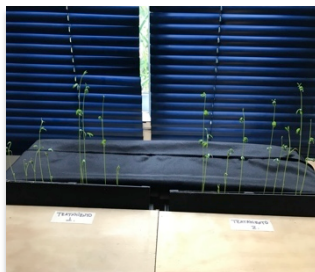
Ilustración 31. Ensayo No.2 Crecimiento parte aérea de *L. culinaris* en persencia de Cr⁶⁺ , Silicato de Magnesio y *Ochrobactrum*, *Trichoderma* , *Scedosporium* y *Bacillus*. Tratamientos 1 2 y 3 .

Tratamiento 4



- Inceptisol (I) vs. Andisol(D)
- 50 ppp Cromo a cada suelo
- Silicato de Magnesio así:
 - Andisol: 0,52 g.Kg⁻¹
 - Inceptisol 1.04 g.Kg⁻¹
- Ochrobactrum + Trichoderma+ Scedosporium+Bacillus

Tratamientos 1vs. 2



Tratamientos 3 vs. 4

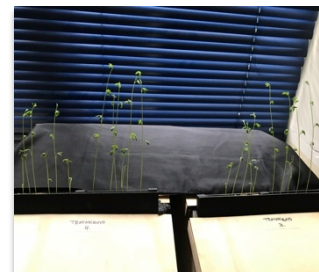


Ilustración 32. Ensayo No.2 Crecimiento parte aérea de *L. culinaris* en persencia de Cr⁶⁺ , Silicato de Magnesio y *Ochrobactrum*, *Trichoderma* , *Scedosporium* y *Bacillus*. Tratamiento 4 y comparativos de tratamientos 1 vs 2 y 3 vs 4.

En el ensayo No.2 La presencia del consorcio microbial (CM) en el tratamiento 3, así como del silicato de Magnesio + CM en el tratamiento 4 parece tener un efecto marcado a nivel visual entre los tratamientos 1-3 y 1-4, especialmente al observar altura de las plantas más no en raíz como lo denota la ilustración 33. Al escrutar esta situación estadísticamente se observa una fuerte significancia de todos los tratamientos (1 al 4) sobre el factor suelo (Anexo E-1).



Ilustración 33. Ensayo No.2 Crecimiento raíz de *L. culinaris* en persencia de Cr⁶⁺, Silicato de Magnesio y *Ochrobactrum*, *Trichoderma* , *Scedosporium* y *Bacillus*.

Detállese la diferencia Andisol (Izq.) vs Inceptisol (Der.) tratamientos 1 a 4 . El color negro refleja altos contenidos de materia orgánica típicos del Andisol, en el cual las raíces pueden explorar un mayor volumen de suelo. El color ocre refleja presencia de arcillas en los inceptisoles y allí el cromo parece limitar más el crecimiento radical. El silicato de magnesio sugiere un mejor desarrollo de la raíz en Andisol, tratamientos 1 vs 2.

Tabla 33. Ensayo No. 3 Desviación estándar y promedios de crecimiento de raíz y altura de *L. culinaris*, en presencia de Cr^{6+} , biosólidos, silicato de magnesio y los microorganismos *Ochrobactrum anthropi*, *Bacillus cereus*, *Scedosporium dehoogii* y *Trichoderma* sp.

Tratamiento	Longitud raíz (cm)	Desv. Estándar	Altura planta (cm)	Desv. Estándar
1-S1	12,08	0,93	22,55	3,11
1-S2	10,77	1,67	22,77	1,98
2-S1	12,48	1,23	22,92	3,98
2-S2	11,72	1,78	19,87	6,19
3-S1	11,76	1,85	24,18	1,34
3-S2	7,83	3,98	18,48	3,33
4-S1	10,18	1,64	22,00	1,79
4-S2	6,77	1,38	15,25	5,49

Suelo 1= Andisol ; Suelo 2 = Inceptisol

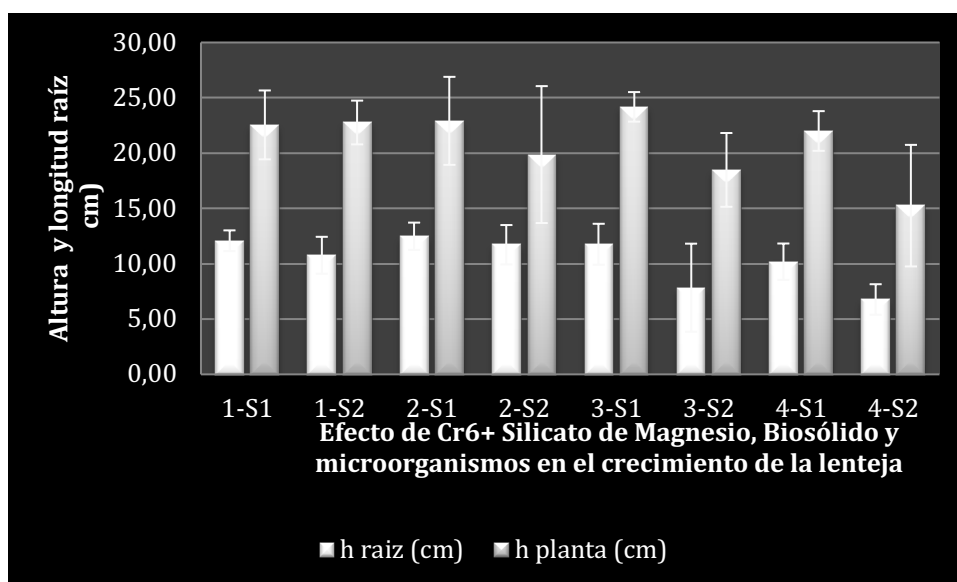


Ilustración 34. Crecimiento de raíz y altura de *L. culinaris*, en presencia de Cr^{6+} , biosólidos, silicato de magnesio y los microorganismos *Ochrobactrum anthropi*, *Bacillus cereus*, *Scedosporium dehoogii*, *Trichoderma* sp..

Al comparar los tratamientos 1, 2 y 3 (Ilustración 34), con el tratamiento 4, puede contrastarse la diferencia de los sistemas radicales desarrollados en 1, 2 y 3 vs. 4 con diferencia importante. Esta situación se visualiza también en la parte aérea de la planta 1, 2, 3 vs. 4. Compárese también en Andisol (Izq.) vs Inceptisol (Der.) al interior del tratamiento 4 (Ilustración 35) la sensible diferencia en favor del Andisol, lo cual queda refrendado por el ANOVA que reporta en este caso diferencia estadística significativa tanto para el factor suelo (raíz y altura) como para tratamientos (sólo raíz). En este caso no hubo significancia estadística para la interacción suelo*tratamiento (Anexo E-2).

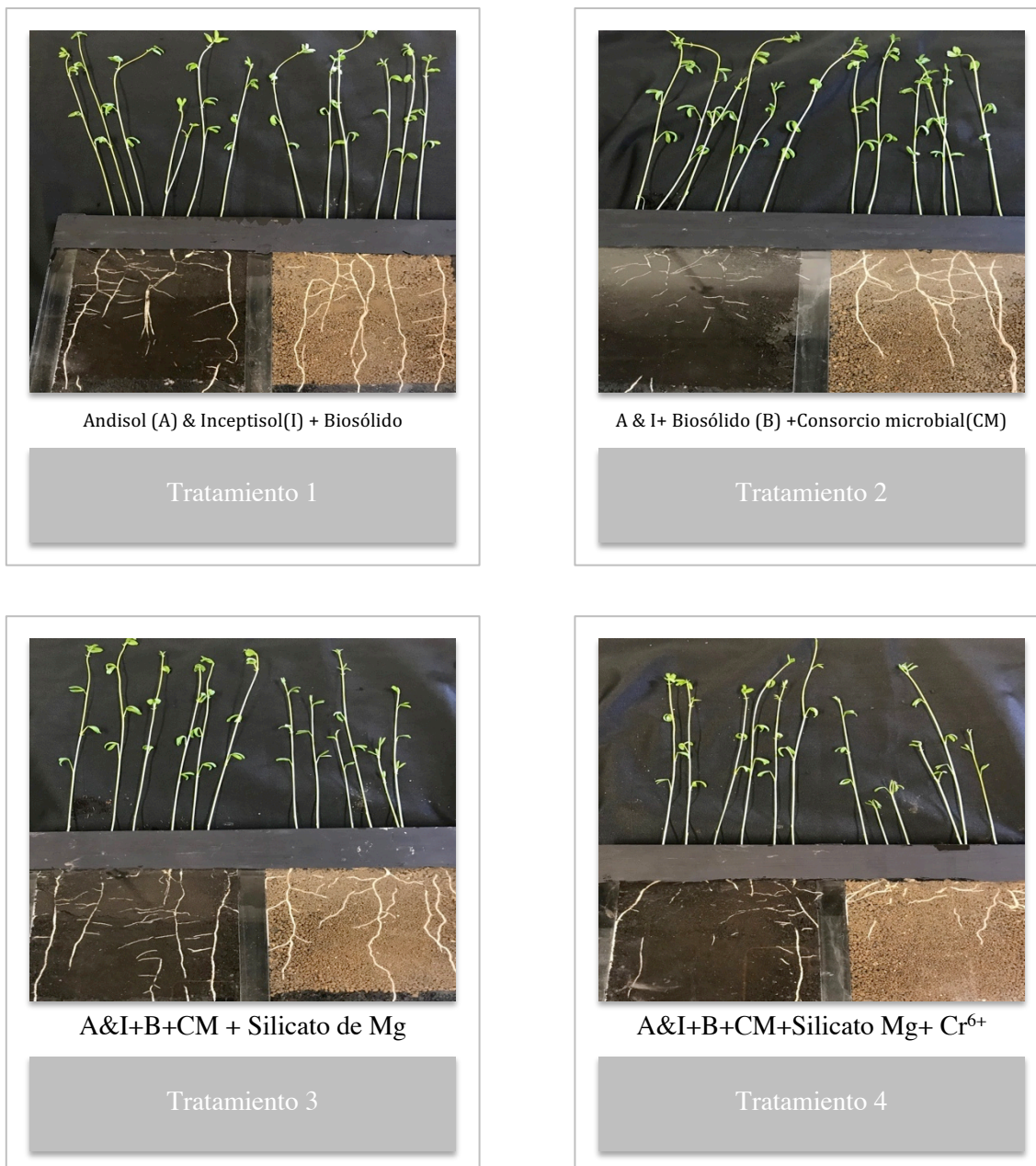


Ilustración 35. Ensayo No.3. Crecimiento raíz y parte aérea de *L. culinaris* en presencia de Cr⁶⁺, biosólido, Silicato de Magnesio, y *Ochrobactrum*, *Trichoderma*, *Scedosporium* y *Bacillus*.

La ilustración 35 compara los diferentes tratamientos 1 a 4 del ensayo No.3 en el que no se presentó diferencia estadística significativa entre los tratamientos para la variable altura, mas si para la longitud de la raíz.

Puede apreciarse en el tratamiento 4 que el Andisol (Izq.) parecería tolerar mejor la dosis de Cr⁶⁺ que el Inceptisol (Der.) para las dos variables evaluadas, altura y longitud de la raíz. Al comparar únicamente la altura de la planta y el aspecto general de manera visual, puede apreciarse sólo ligeramente retrasada con relación a sus homólogos en 1, 2 y 3.

Resulta aquí interesante poner en evidencia que la sola variable altura de la planta, no sería suficiente argumento en este caso para comparar tratamientos y se requiere de un escrutinio adicional, que en este caso resulta ser la longitud de la raíz. Numerosas investigaciones que evalúan sólo altura de las plantas, podrían quedarse cortas al concluir y hasta errar su apreciación si sólo se escruta esa variable. La ayuda visual del Rhizotron en esta oportunidad orientó la necesidad de confirmar los resultados mediante la prueba de ANOVA, confirmando que en el caso de la raíz, si presenta la significancia estadística.

Se dice que hay una correspondencia directamente proporcional entre raíz y parte aérea de la planta pero se aprecia en este caso, que esto no se cumple y es posible que ello pueda atribuirse a la acción del biosólido que sería el único elemento común a los tratamientos y que, como en pruebas precedentes conducidas por el doctorando en su tesis de maestría, pudo verificar que el comportamiento agronómico y el vigor germinativo de plantas de caña, frijol y pastos, tratadas con biosólidos de la PTAR San Fernando superaron los demás sustratos en todos los ensayos.

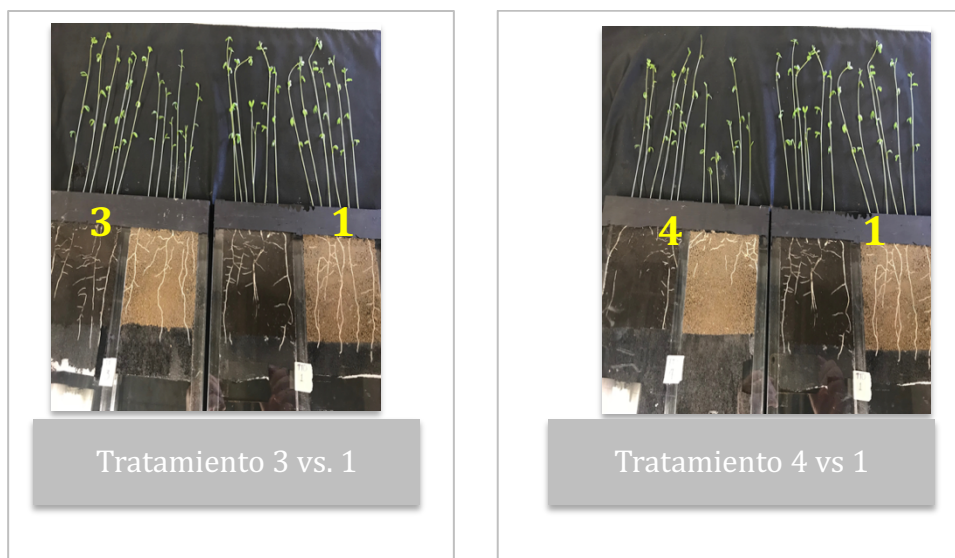


Ilustración 36. Ensayo No.3. Comparación de tratamientos Crecimiento raíz y altura de *L. culinaris* en presencia de Cr^{6+} , biosólido, silicato de magnesio y *Ochrobactrum*, *Trichoderma Scodosporium* y *Bacillus*.

2.5.6. DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en las pruebas llevadas a cabo con Rhizotrones, favorecen el crecimiento aéreo y radicular de la lenteja *L. culinaris* en texturas francas como las del Andisol, con altos contenidos de materia orgánica que podrían contribuir a la reducción de Cr^{6+} a Cr^{3+} , estimulando el crecimiento como en el tratamiento 4 del ensayo No. 3 (único con presencia de cromo en el tercer ensayo). Los altos contenidos de materia orgánica del suelo Andisol, superan los contenidos del Inceptisol y hoy es aceptado que el carbono orgánico se comporta como un gran agente reductor y que la materia orgánica normalmente presenta gran cantidad de cargas negativas que muestran afinidad por la captura de cationes.

También se conoce que la calidad y cantidad de la materia orgánica determinan la actividad y diversidad microbial, factor clave en la fertilidad del suelo, que contribuye a la estabilidad y funcionamiento (estructura y función) de los ecosistemas naturales y de los agrosistemas. La acción combinada de medios químicos y biológicos puede resultar efectiva y sinérgica para explicar la adsorción de cromo hexavalente en el suelo y medios acuosos y la absorción al interior de la célula con gasto de energía para un posible secuestro vacuolar. Esto podría explicar también el mejor desarrollo de las plantas en los tratamientos que tuvieron microorganismos y silicato de magnesio en los Rhizotrones.

En la mineralización de la materia orgánica se liberan cantidades apreciables de nitrógeno, azufre, fósforo y algunos micronutrientes esenciales para el crecimiento y producción de las plantas. Así mismo hay liberación de energía para la fijación bacteriana del Nitrógeno. La cantidad requerida para fijar una molécula de N_2 varía de un sistema a otro. Por ejemplo *Azotobacter* sp requiere 4 ó 5 ATPs mientras *Klebsiella* requiere 29 ATPs y *Clostridium pasteurianum* 20 ATPs.

Uno de los aspectos que más inquietud genera entre los investigadores es lograr la estabilidad de las formas de cromo adsorbidas y evitar la desorción, al igual que lograr que la bioestabilidad del cromo reducido por acción microbial permanezca. No obstante, hay pocas evidencias de autores trabajando en ello de manera sistemática y sostenida y por el contrario muchos trabajos reportan éxito en los objetivos propuestos para la remoción del cromo, pero no dan cuenta de la estabilidad de las formas reducidas o removidas ni del tiempo que pueden permanecer así.

Sharma y Malaviya, (2016) trabajando en lodos y aguas de curtiembres en la India, evaluaron un consorcio microbiano compuesto por *Cladosporium perangustum*, *Penicillium comune*, (aislado de aguas) y *Paecilomyces lilacinus* y *Fusarium equiseti*, (aislados en lodos) dispuestos sobre una malla de nylon como soporte de la biomasa fúngica del consorcio y encontraron buenas respuestas en la reducción de varios parámetros de contaminación, donde sobresalieron la remoción de Cr^{6+} (100%) y cromo total (99.92), pero encontraron que la mayor reducción del metal se conseguía en las primeras 24 horas. Así mismo encontraron estos autores, que la germinación de semillas de trigo regadas con aguas de curtiembres tratadas con el consorcio, se redujo del 100 % de inhibición de la germinación en aguas no tratadas, a 49.3 % de germinación en las aguas que recibieron bioremediación (Smiley Sharma & Malaviya, 2016).

Se conoce que la gran mayoría de organismos, independiente de su situación filogenética, poseen familias de transportadores específicos que contribuyen a la transferencia al interior de la célula. Se sabe por ejemplo, que todos ellos tienen varios dominios trans-membrana que presentan en los extremos N- y C- donde se forman bucles de diferente extensión que determinan el catión a transportar y diferentes aminoácidos que determinarían el canal por el cual se introducen y/o retiran cationes del citoplasma. Lo anterior contribuye a remover cromo de ambientes que lo contienen para secuestrarlo a nivel citoplasmático de los organismos remediadores. Smiley Sharma & Malaviya, (2016), mencionan que son varios los mecanismos propuestos para la detoxificación y plantean la absorción a través de la membrana celular y la biosorción o adsorción del metal a la membrana celular, como mecanismos de primera importancia.

Así mismo, la fracción humificada del suelo, encuentra en los ácidos fúlvicos, húmicos y huminas la habilidad de constituir ciertos tipos de quelatantes o acomplejantes que pueden ser usados por plantas hiperacumuladoras o por microorganismos para la transferencia de metales, o simplemente permitir que la quelación se logre por medio de acomplejantes fuertes que contribuyan a la estabilidad de la forma hexavalente de cromo en el suelo. Investigadores de la Universidad de Colorado, demostraron que la actividad biológica estimulada con adición de carbono y nitrógeno resulta en un aumento significativo de la estabilidad del cromo reducido en el suelo, impidiendo su desorción (Bielefeldt & Vos, 2014).

Otro aspecto que debe ser tenido en cuenta y que ha sido poco investigado referente a los consorcios microbianos, son las pruebas de antagonismo y también la estabilidad del consorcio. Smiley Sharma & Malaviya, (2016), llevaron a cabo algunas pruebas de biocompatibilidad con las 4 especies evaluadas *C. perangustum*, *P. comune*, *P. lilacinus* y *F. equiseti*, incubados en cajas Petri con PDA, pero no reportan antagonismos importantes.

2.5.7. CONCLUSIÓN

La acción química y microbial cuando actúan conjuntamente con fines de remediación de cromo, no parecen competir por la ruta o el mecanismo de detoxificación, sino que más bien parecen complementarse en su accionar favoreciendo la recuperación en el crecimiento de la lenteja sometida a la acción del metal.

3.0 Conclusiones

CAPÍTULO A.

Los organismos indígenas aislados en la fuente de la contaminación por cromo o en la PTAR San Fernando, presentaron mejor capacidad para remover cromo que microorganismos exógenos

CAPÍTULO B.

Muchas bacterias y hongos filamentosos desarrollan mecanismos de cromotolerancia cuando crecen en medios enriquecidos con cromo que les permite remover el metal de manera eficiente.

CAPÍTULO C.

Contenidos de Cr^{6+} de 2400 ppm, adicionados a Andisoles e Inceptisoles en invernadero, en macetas plásticas de 2 kilogramos, mostraron mayor porcentaje de remoción del cromo por acción de los microorganismos que concentraciones entre 100 y 1200 ppm.

Los géneros bacterianos como *Masillia*, *Burkholderia*, *Myroides*, *Terrabacter*, *Lysobacter*, *Devosia*, *Phingomonas*, hallados en la prueba de metadiversidad bacteriana, no aparecen reportados en la bioremediación de cromo y podrían tener potencial para este propósito.

CAPÍTULO D.

El silicato de magnesio mezclado al 10 % p/p, con biosólidos que contenían 150 mg kg^{-1} de cromo y otros metales en bajas cantidades, neutralizó el 100 % de 4 metales (Ar, Cd, Cr, Pb), con excepción del níquel.

CAPÍTULO E

El uso del silicato de magnesio en combinación con un consorcio microbial conformado por *Ochrobactrum*, *Bacillus*, *Trichoderma* y *Scedosporium* pueden ayudar a restaurar el crecimiento de plantas de lenteja *L. culinaris* retrasadas en su desarrollo por la presencia de Cr^{6+} .

En suelos de tipo Andisol la adición de Cr^{6+} a plantas de lenteja *L. culinaris* afecta menos el crecimiento que en suelos de tipo Inceptisol, probablemente por el contenido de materia orgánica que ayudaría reducir el cromo a Cr^{3+} .

4.0 Recomendaciones para EPM

Colombia, como región del trópico húmedo, con lluvias torrenciales a lo largo del año, relieve de ladera, pendientes largas y pronunciadas en ocasiones sobre-pastoreadas con ganados, suelos altamente erodables y cultivos limpios en zonas montañosas con tala de bosques, tiene procesos de desertización con altas dinámicas en todas sus fases, que requieren de aportes externos de naturaleza orgánica, sin que existan en el país industrias que generen residuos en cantidades importantes como lo podría hacer la “industria” de los residuos urbanos y concretamente los biosólidos de cualquier PTAR, si se conocen sus características físico-químicas y se gestionan adecuadamente las condiciones ex-ante y ex-post.

- Los biosólidos podrían ser empleados como enmiendas asimilables a orgánicas y minerales si se observan algunos cuidados y se conocen algunos parámetros que permitan establecer gestión, vigilancia y restricciones, de ser requeridas. Las condiciones que deben regir una enmienda al suelo al momento de elegir y ajustar una tasa agronómica fundamentalmente son: la textura, el contenido de materia orgánica, el pH, las condiciones redox y el tipo de cultivo.
- Las aplicaciones de biosólidos, deben considerar forma, dosis y frecuencia y deberán tener presente además el régimen de lluvias, su intensidad y distribución, así como, la longitud de la pendiente, la distancia a los cuerpos de agua, la estacionalidad en las labores culturales en relación con los operarios, el control de olores relacionados con las comunidades vecinas y el período de carencia desde la aplicación hasta la cosecha, principalmente.
- Algunas otras condiciones podrían gravitar al momento de elegir dosis, frecuencia y formas de aplicación de los biosólidos como son: permeabilidad e infiltración, curvas de retención de humedad del suelo y profundidad del manto acuífero, entre otras, pero resultan en una limitante práctica a la hora de tomar una determinación.
- El protocolo PCOS (Potencial Chromium Oxidation Score) desarrollado por James y colaboradores (1997), está basado en cuatro parámetros interactuantes: i) la solubilidad y forma de Cr^{+3} , ii) la reactividad del Mn en el suelo, iii) el potencial de reducción de Cr^{6+} y iv) el pH como modificador de los parámetros anteriores; debería ser revisado y adaptado en una PTAR de manera pragmática y ágil, como parte de los protocolos para quienes apliquen biosólidos como enmienda organomineral al suelo.
- Desarrollar una metodología sencilla para evaluar la reactividad del manganeso en los sitios donde habrá de liberarse biosólidos, podría ser un factor clave que asegure con alto grado de confiabilidad si se propiciará o no, la oxidación del Cr^{3+} a Cr^{6+} .
- Aplicar silicato de magnesio a granel, a los biosólidos, en proporción del 10 % p/p podría fijar el cromo de tal manera que sea menos lábil y menos biodisponible una vez sean liberados al suelo.
- Asperjar biosólidos al interior de una PTAR, antes de disponerlos en el campo, con consorcios microbianos que contengan varias de las siguientes especies: *Ochrobactrum antropi*, *O. intermedium*, *Bacillus amyloliquefacien*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. firmus*, *Staphylococcus saprophyticus* y los hongos *Scedosporium dehoogii*, *S. boydii*, *Paecilomyces lilacinus* y *Trichoderma* sp., podría ayudar notablemente a reducir el Cr^{6+} o removerlo a través de diferentes mecanismos fúngicos o bacteriales, haciéndolo menos biodisponible para las plantas y para el medio ambiente, mitigando su magnificación.

- Los biosólidos son extremadamente complejos y sus posibilidades de bioremediación bastante desconocidas aún. Debería contemplarse la investigación de manera permanente y sistemática.

ANEXOS

ANEXO: Estandarización del método de la Difenilcarbazida para determinar Cr⁶⁺ en presencia de Microorganismos bioremediadores.

Capitulo A-1. Biomasa de *Bacillus subtilis* incubado en diferentes concentraciones de Cr ⁶⁺ y Cr ³⁺ mg L⁻¹ en presencia de Difenilcarbazida por 7 días a 28 °C y 100 rpm.

Variación en las concentraciones de Cr 6+									
Muestra		Absorbancia [A]			[mg/L]				
Forma de Cromo	Concentraci on inicial [mg/L]	Abs. Sin reactivo	Abs. Con reactivos	Abs. Real	Concentracion Cr 6+	Factor de Dilución	Concentracion final Cr 6+	Reduccion(ppm)	Promedio de Reduccion
Cr 6+	200C	0,001	0,0164	0,0154	0,1007	1000	100,7	99,2867	99,2867
	200	0	0,084	0,084	0,2010	1000	201,0	-0,9996	5,3353
	200	0	0,078	0,078	0,1922	1000	192,2	7,7718	
	200	0	0,077	0,077	0,1908	1000	190,8	9,2337	
	400C	0,004	0,154	0,15	0,2975	1000	297,5	102,5150	102,5150
	400	0	0,081	0,081	0,1966	1000	196,6	203,3861	201,9242
	400	0	0,082	0,082	0,1981	1000	198,1	201,9242	
	400	0	0,083	0,083	0,1995	1000	199,5	200,4623	
	800C	0,003	0,209	0,206	0,3794	1000	379,4	420,6486	420,6486
	800	0	0,17	0,17	0,3267	1000	326,7	473,2770	480,5865
	800	0	0,164	0,164	0,3180	1000	318,0	482,0484	
	800	0	0,161	0,161	0,3136	1000	313,6	486,4341	
	1200C	0	0,377	0,377	0,6293	1000	629,3	570,6637	570,6637
	1200	0	0,414	0,414	0,6834	1000	683,4	516,5734	650,5809
	1200	0	0,288	0,288	0,4992	1000	499,2	700,7728	
	1200	0	0,265	0,265	0,4656	1000	465,6	734,3965	
	1600C	0,001	0,488	0,487	0,7901	1000	790,1	809,8547	809,8547
	1600	0,001	0,456	0,455	0,7434	1000	743,4	856,6355	864,4323
	1600	0,001	0,462	0,461	0,7521	1000	752,1	847,8641	
	1600	0,001	0,434	0,433	0,7112	1000	711,2	888,7973	
	2000C	0	0,465	0,465	0,7580	1000	758,0	1242,0165	1242,0165
	2000	0,001	0,641	0,64	1,0138	1000	1013,8	986,1840	965,7174
	2000	0,001	0,677	0,676	1,0664	1000	1066,4	933,5556	
	2000	0,001	0,647	0,646	1,0226	1000	1022,6	977,4126	

Capítulo A-1. 1Biomasa de *Rhizobium* sp. incubado en diferentes concentraciones de Cr ⁶⁺ y Cr ³⁺ mg L⁻¹ en presencia de Difenilcarbazida por 7 días a 28 °C y 100 rpm.

Variación en las concentraciones de Cr 6+									
Muestra Rhizobium		Absorbancia [A]			[mg/L]				
Forma de Cromo	Concentración inicial [mg/L]	Abs. Blanco	Abs. reactivos	Abs. Real	Concentración Cr 6+	Factor de Dilución	Concentración final Cr 6+	Reducción(p pm)	Promedio de reducción
Cr 6+	200C	0,000	0,155	0,155	0,305	1000	304,7945	-104,7945	-104,7945
	200	0,000	0,118	0,118	0,251	1000	250,7042	-50,7042	-21,4662
	200	0,000	0,102	0,102	0,227	1000	227,3138	-27,3138	
	200	0,000	0,074	0,074	0,186	1000	186,3806	13,6194	
	400C	0,000	0,165	0,165	0,319	1000	319,4135	80,5865	80,5865
	400	0,001	0,114	0,113	0,243	1000	243,3947	156,6053	167,3259
	400	0,002	0,099	0,097	0,220	1000	220,0043	179,9957	
	400	0,002	0,109	0,107	0,235	1000	234,6233	165,3767	
	800C	0,002	0,243	0,241	0,431	1000	430,5179	369,4821	369,4821
	800	0,001	0,183	0,182	0,344	1000	344,2658	455,7342	336,3457
	800	0,001	0,316	0,315	0,539	1000	538,6985	261,3015	
	800	0,001	0,295	0,294	0,508	1000	507,9986	292,0014	
	1200C	0,002	0,638	0,636	1,008	1000	1007,9684	192,0316	192,0316
	1200	0,002	0,330	0,328	0,558	1000	557,7032	642,2968	679,8189
	1200	0,003	0,270	0,267	0,469	1000	468,5273	731,4727	
	1200	0,003	0,315	0,312	0,534	1000	534,3128	665,6872	
	1600C	0,002	0,461	0,459	0,749	1000	749,2121	850,7879	850,7879
	1600	0,002	0,376	0,374	0,625	1000	624,9506	975,0494	860,5339
	1600	0,003	0,501	0,498	0,806	1000	806,2262	793,7738	
	1600	0,003	0,488	0,485	0,787	1000	787,2215	812,7785	
	2000C	0,003	0,698	0,695	1,094	1000	1094,2205	905,7795	905,7795
	2000	0,003	0,609	0,606	0,964	1000	964,1114	1035,8886	979,8491
	2000	0,003	0,644	0,641	1,015	1000	1015,2779	984,7221	
	2000	0,001	0,687	0,686	1,081	1000	1081,0634	918,9366	

Capítulo A-1. 2 Biomasa de *Paecilomyces lilacinus* incubado en diferentes concentraciones de Cr⁶⁺ y Cr³⁺ mg L⁻¹ en presencia de Difenilcarbazida por 7 días a 28 °C y 100 rpm.

Variación en las concentraciones de Cr 6+									
Muestra		Absorbancia [A]			[mg/L]				
Forma de Cromo	Concentraci on inicial [mg/L]	Abs. Blanco	Abs. reactivos	Abs. Real	Concentracion Cr 6+	Factor de Dilución	Concentracion final Cr 6+	Reduccion(ppm)	Promedio de reduccion
Cr 6+	200C	0,000	0,094	0,094	0,216	1000	215,6186	-15,6186	-15,6186
	200	0,000	0,100	0,100	0,224	1000	224,3900	-24,3900	-33,6487
	200	0,000	0,126	0,126	0,262	1000	262,3994	-62,3994	
	200	0,000	0,093	0,093	0,214	1000	214,1567	-14,1567	
	400C	0,000	0,090	0,090	0,210	1000	209,7710	190,2290	190,2290
	400	0,001	0,113	0,112	0,242	1000	241,9328	158,0672	155,1434
	400	0,000	0,111	0,111	0,240	1000	240,4709	159,5291	
	400	0,000	0,119	0,119	0,252	1000	252,1661	147,8339	
	800C	0,000	0,191	0,191	0,357	1000	357,4229	442,5771	442,5771
	800	0,000	0,219	0,219	0,398	1000	398,3561	401,6439	393,3598
	800	0,003	0,223	0,220	0,400	1000	399,8180	400,1820	
	800	0,000	0,235	0,235	0,422	1000	421,7465	378,2535	
	1200C	0,000	0,250	0,250	0,444	1000	443,6750	756,3250	756,3250
	1200	0,000	0,292	0,292	0,505	1000	505,0748	694,9252	673,4840
	1200	0,000	0,300	0,300	0,517	1000	516,7700	683,2300	
	1200	0,000	0,328	0,328	0,558	1000	557,7032	642,2968	
	1600C	0,000	0,388	0,388	0,645	1000	645,4172	954,5828	954,5828
	1600	0,000	0,456	0,456	0,745	1000	744,8264	855,1736	904,8782
	1600	0,001	0,403	0,402	0,666	1000	665,8838	934,1162	
	1600	0,000	0,408	0,408	0,675	1000	674,6552	925,3448	
	2000C	0,000	0,607	0,607	0,966	1000	965,5733	1034,4267	1034,4267
	2000	0,000	0,608	0,608	0,967	1000	967,0352	1032,9648	1028,5791
	2000	0,000	0,650	0,650	1,028	1000	1028,4350	971,5650	
	2000	0,000	0,575	0,575	0,919	1000	918,7925	1081,2075	

Capítulo A-1.3 Biomasa de *ETCR 10* incubado en diferentes concentraciones de Cr^{6+} y Cr^{3+} mg L^{-1} en presencia de Difenilcarbazida por 7 días a 28°C y 100 rpm.

Variación en las concentraciones de Cr^{6+}									
Muestra ETCR 10		Absorbancia [A]			[mg/L]				
Forma de Cromo	Concentración inicial [mg/L]	Abs. Blanco	Abs. reactivos	Abs. Real	Concentración Cr^{6+}	Factor de Dilución	Concentración final Cr^{6+}	Reducción	Promedio de reducción
Cr^{6+}	200C	0,002	0,007	0,005	0,008	10000	84,8500	115,1500	115,1500
	200	0,000	0,005	0,005	0,008	10000	84,8500	115,1500	115,1500
	200	0,001	0,008	0,007	0,013	10000	134,7900	65,2100	
	200	0,002	0,005	0,003	0,003	10000	34,9100	165,0900	
	400C	0,001	0,008	0,007	0,013	10000	134,7900	265,2100	265,2100
	400	0,000	0,005	0,005	0,008	10000	84,8500	315,1500	290,1800
	400	0,002	0,010	0,008	0,016	10000	159,7600	240,2400	
	400	0,000	0,005	0,005	0,008	10000	84,8500	315,1500	
	800C	0,002	0,009	0,007	0,013	10000	134,7900	665,2100	665,2100
	800	0,000	0,010	0,010	0,021	10000	209,7000	590,3000	457,1267
	800	0,000	0,022	0,022	0,051	10000	509,3400	290,6600	
	800	0,002	0,016	0,014	0,031	10000	309,5800	490,4200	
	1200C	0,000	0,016	0,016	0,036	10000	359,5200	840,4800	840,4800
	1200	0,000	0,021	0,021	0,048	10000	484,3700	715,6300	657,3667
	1200	0,001	0,020	0,019	0,043	10000	434,4300	765,5700	
	1200	0,000	0,030	0,030	0,071	10000	709,1000	490,9000	
	1600C	0,002	0,014	0,012	0,026	10000	259,6400	1340,3600	1340,3600
	1600	0,001	0,033	0,032	0,076	10000	759,0400	840,9600	957,4867
	1600	0,000	0,030	0,030	0,071	10000	709,1000	890,9000	
	1600	0,003	0,023	0,020	0,046	10000	459,4000	1140,6000	
	2000C	0,002	0,033	0,031	0,073	10000	734,0700	1265,9300	1265,9300
	2000	0,003	0,031	0,028	0,066	10000	659,1600	1340,8400	1424,0733
	2000	0,001	0,023	0,022	0,051	10000	509,3400	1490,6600	
	2000	0,001	0,025	0,024	0,056	10000	559,2800	1440,7200	

Capítulo A-1. 4 Biomasa de *CC 13* incubado en diferentes concentraciones de Cr ⁶⁺ y Cr ³⁺ mg L⁻¹ en presencia de Difenilcarbazida por 7 días a 28 °C y 100 rpm.

Variación en las concentraciones de Cr 6+									
Muestra		Absorbancia [A]			[mg/L]				
Forma de Cromo	Concentraci on inicial [mg/L]	Abs. Blanco	Abs. reactivos	Abs. Real	Concentracion Cr 6+	Factor de Dilución	Concentracion final Cr 6+	Reduccion (ppm)	Promedio de reduccion
Cr 6+	200C	0,002	0,000	0,000	-0,004	10000	0,0000	200,0000	200,0000
	200	0,003	0,000	0,000	-0,004	10000	0,0000	200,0000	200,0000
	200	0,000	0,000	0,000	-0,004	10000	0,0000	200,0000	
	200	0,001	0,000	0,000	-0,004	10000	0,0000	200,0000	
	400C	0,001	0,000	0,000	-0,004	10000	0,0000	400,0000	400,0000
	400	0,004	0,001	0,000	-0,004	10000	0,0000	400,0000	388,3633
	400	0,003	0,004	0,001	-0,002	10000	0,0000	400,0000	
	400	0,001	0,004	0,003	0,003	10000	34,9100	365,0900	
	800C	0,001	0,007	0,006	0,011	10000	109,8200	690,1800	690,1800
	800	0,000	0,009	0,009	0,018	10000	184,7300	615,2700	573,6533
	800	0,001	0,014	0,013	0,028	10000	284,6100	515,3900	
	800	0,001	0,011	0,010	0,021	10000	209,7000	590,3000	
	1200C	0,001	0,018	0,017	0,038	10000	384,4900	815,5100	815,5100
	1200	0,000	0,016	0,016	0,036	10000	359,5200	840,4800	832,1567
	1200	0,004	0,019	0,015	0,033	10000	334,5500	865,4500	
	1200	0,002	0,020	0,018	0,041	10000	409,4600	790,5400	
	1600C	0,004	0,030	0,026	0,061	10000	609,2200	990,7800	990,7800
	1600	0,001	0,031	0,030	0,071	10000	709,1000	890,9000	924,1933
	1600	0,000	0,026	0,026	0,061	10000	609,2200	990,7800	
	1600	0,000	0,030	0,030	0,071	10000	709,1000	890,9000	
	2000C	0,000	0,048	0,048	0,116	10000	1158,5600	841,4400	841,4400
	2000	0,001	0,040	0,039	0,093	10000	933,8300	1066,1700	849,7633
	2000	0,002	0,053	0,051	0,123	10000	1233,4700	766,5300	
	2000	0,000	0,053	0,053	0,128	10000	1283,4100	716,5900	

Anexo A-2. Análisis Estadístico. Bioremediadores de Cr^{6+} Factorial 5x7. ANOVA Programa R. Ver 5.3.1.

Analisis Estadistico Capitulo A

A fin de evaluar 5 Bioremediadores **ETCR10 (biotipo bacteriano)** , **Bs (Bacillus subtilis)**, **CC13 (biotipo bacteriano)**, **Pli (Paecilomyces lilacinus)** y **Rh (Rhizobium sp)** a siete concentraciones diferentes **0, 200, 400, 800, 1200, 1600 y 2000 ppm (CrVI+)**, se configura asi un experimento de naturaleza factorial con tres repeticiones por tratamiento; es decir las diferentes combinaciones resultantes entre los diferentes niveles de los factores en cuestion.

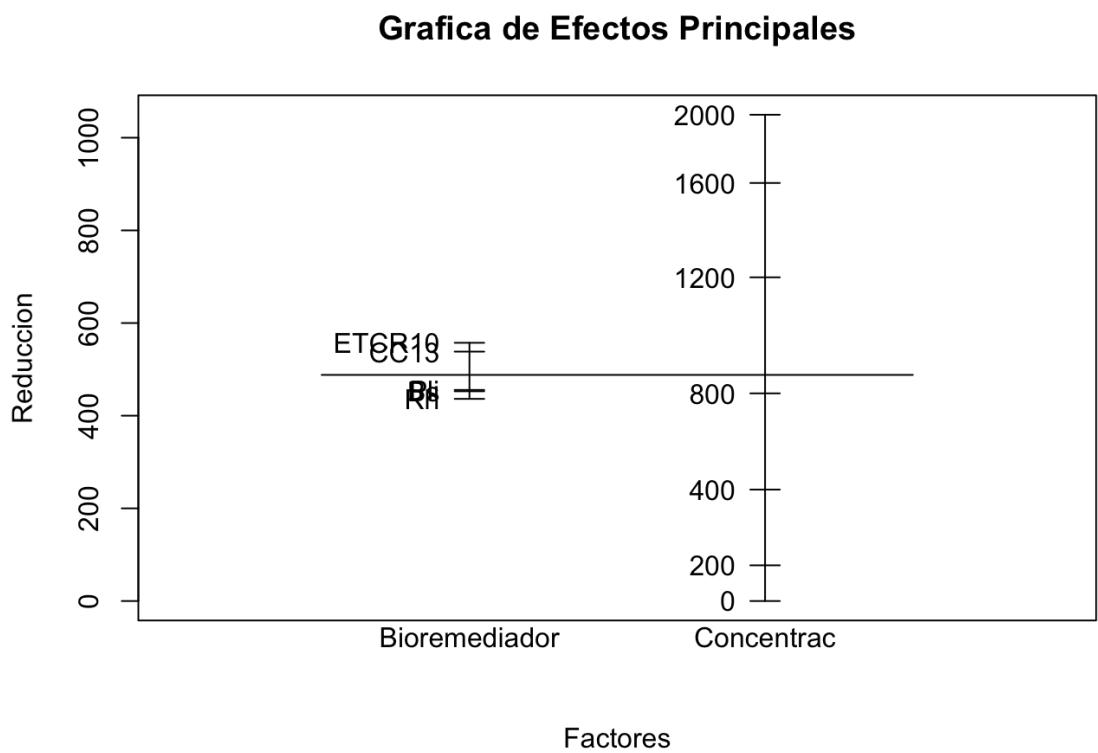
A continuacion se muestra el analisis de varianzas respectivo y los diferentes valores P para los factores evaluados y logicamente la interaccion entre ellos

##	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
## Bioremediador	4	258304	64576	13.081	5.24e-08	***
## Concentrac	6	15018454	2503076	507.036	< 2e-16	***
## Bioremediador:Concentrac	24	697358	29057	5.886	3.03e-09	***
## Residuals	70	345568	4937			
## ---						
## Signif. codes:	0	'***'	0.001	'**'	0.01	'*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

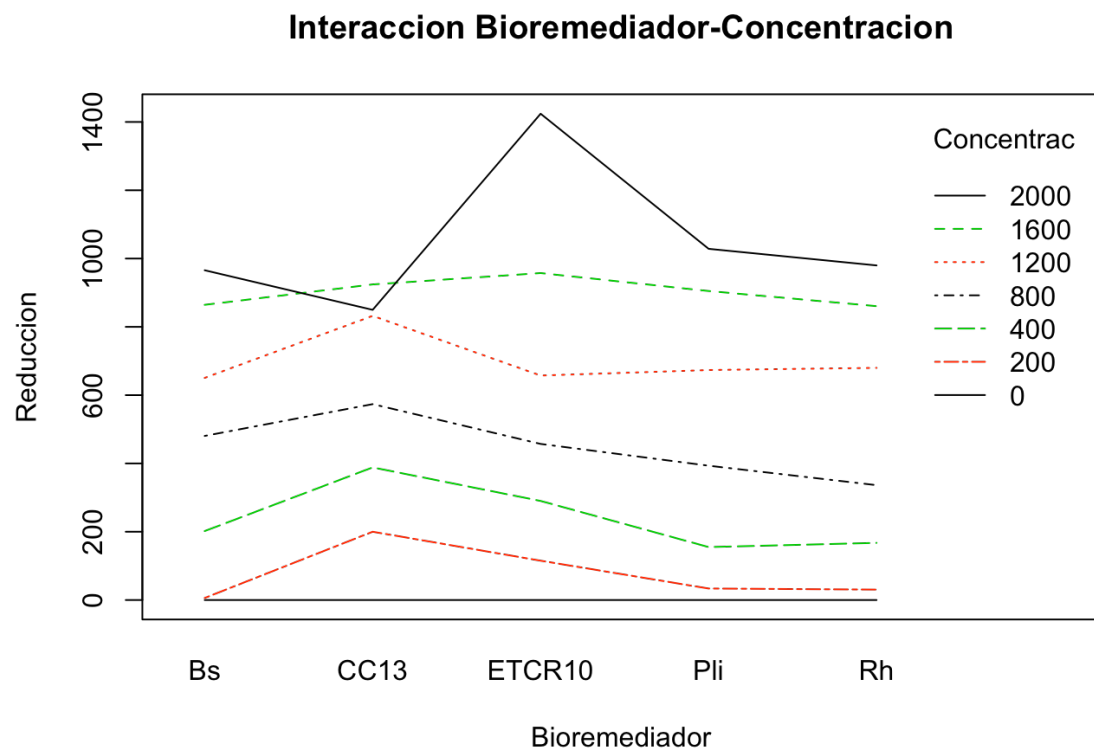
Luego los coeficientes de la ecuacion de regresion.

##	(Intercept)	BioremediadorCC13
##	-3.566065e-13	2.031943e-13
##	BioremediadorETCR10	BioremediadorPli
##	3.959828e-13	1.599455e-13
##	BioremediadorRh	Concentrac200
##	3.512937e-13	6.000000e+00
##	Concentrac400	Concentrac800
##	2.019233e+02	4.805867e+02
##	Concentrac1200	Concentrac1600
##	6.505800e+02	8.644333e+02
##	Concentrac2000	BioremediadorCC13:Concentrac200
##	9.657167e+02	1.940000e+02
##	BioremediadorETCR10:Concentrac200	BioremediadorPli:Concentrac200
##	1.091500e+02	2.765000e+01
##	BioremediadorRh:Concentrac200	BioremediadorCC13:Concentrac400
##	2.454333e+01	1.864400e+02
##	BioremediadorETCR10:Concentrac400	BioremediadorPli:Concentrac400
##	8.825667e+01	-4.678000e+01
##	BioremediadorRh:Concentrac400	BioremediadorCC13:Concentrac800
##	-3.459333e+01	9.306667e+01
##	BioremediadorETCR10:Concentrac800	BioremediadorPli:Concentrac800
##	-2.346000e+01	-8.723000e+01
##	BioremediadorRh:Concentrac800	BioremediadorCC13:Concentrac1200
##	-1.442433e+02	1.815767e+02
##	BioremediadorETCR10:Concentrac1200	BioremediadorPli:Concentrac1200
##	6.786667e+00	2.290667e+01
##	BioremediadorRh:Concentrac1200	BioremediadorCC13:Concentrac1600
##	2.924000e+01	5.976000e+01
##	BioremediadorETCR10:Concentrac1600	BioremediadorPli:Concentrac1600
##	9.305333e+01	4.044333e+01
##	BioremediadorRh:Concentrac1600	BioremediadorCC13:Concentrac2000
##	-3.900000e+00	-1.159533e+02
##	BioremediadorETCR10:Concentrac2000	BioremediadorPli:Concentrac2000
##	4.583567e+02	6.286333e+01
##	BioremediadorRh:Concentrac2000	
##	1.413333e+01	

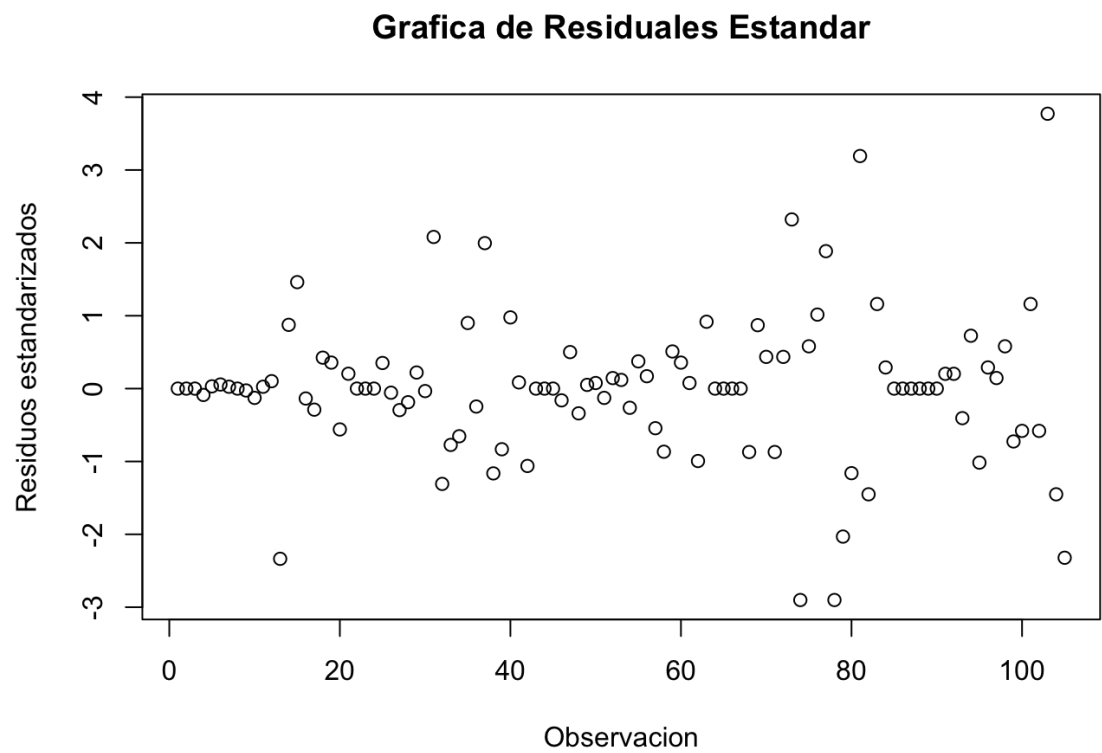
Acorde con un tipo de experimento con estructura factorial, para este analisis de varianza cuya interaccion resulto significativa **se analizan los efectos simples** , sin embargo a titulo de ilustracion se muestra la grafica de los efectos principales.



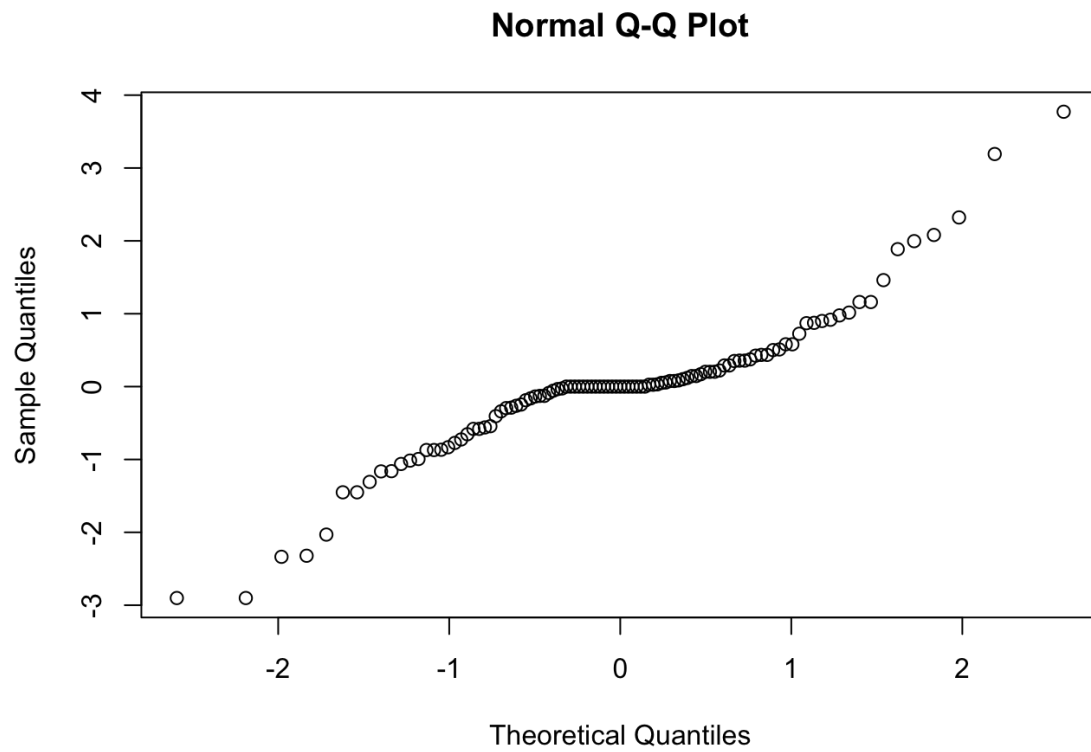
Analisis de la interaccion **Bioremediador x Concentracion**



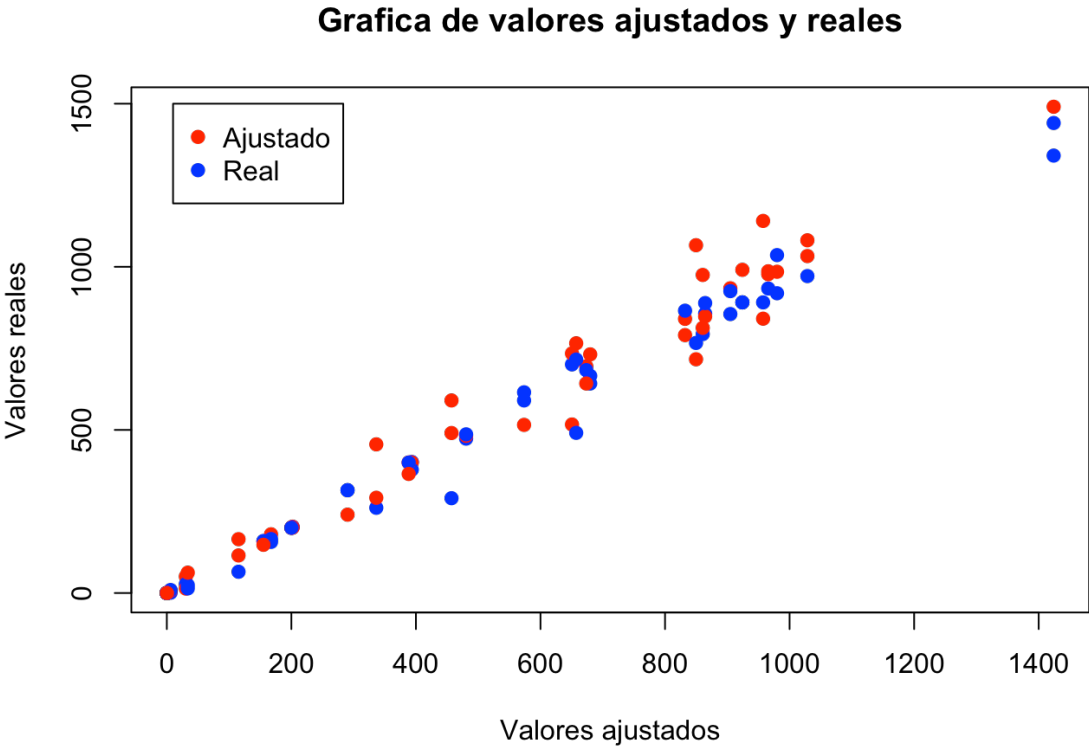
Analisis de los residuales



No se observan visualmente problemas con los datos



Graficando los valores tanto los ajustados de la regresion como los reales



Predeccciones dentro de la region de exploracion (concentraciones entre 0 y 2000 para los descontaminantes probados) Para la concentracion 1600 en todos los niveles del factor Bioremediador: Bs, CC13, ETCR10, Pli y Rh; respectivamente.

##	fit	lwr	upr
## 1	864.4333	783.5280	945.3387
## 2	924.1933	843.2880	1005.0987
## 3	957.4867	876.5813	1038.3920
## 4	904.8767	823.9713	985.7820
## 5	860.5333	779.6280	941.4387

y para la concentracion 2000 en todos los niveles del factor Bioremediador: Bs, CC13, ETCR10, Pli y Rh; respectivamente.

```
##          fit          lwr          upr
## 1  965.7167  884.8113 1046.6220
## 2  849.7633  768.8580  930.6687
## 3 1424.0733 1343.1680 1504.9787
## 4 1028.5800  947.6747 1109.4853
## 5  979.8500  898.9447 1060.7553
```

para el Bioremediador Biotipo bacteriano CC13 a todas las dosis; un efecto simple de la Concentracion en un nivel especifico de un Bioremediador, osea CC13

```
##          fit          lwr          upr
## 1 -1.534122e-13 -80.90534   80.90534
## 2  2.000000e+02 119.09466  280.90534
## 3  3.883633e+02 307.45800  469.26867
## 4  5.736533e+02 492.74800  654.55867
## 5  8.321567e+02 751.25133  913.06200
## 6  9.241933e+02 843.28800 1005.09867
## 7  8.497633e+02 768.85800  930.66867
```

Finalmente, la prediccion de Reduccion del Biotipo bacteriano ETCR10 a todas las dosis (0, 200, 400, 800, 1200, 1600 y 2000 ppm de Cr(VI+) respectivamente un efecto simple de la Concentracion en un nivel especifico de un Bioremediador osea ETCR10

```
##          fit          lwr          upr
## 1 3.937631e-14 -80.90534   80.90534
## 2 1.151500e+02  34.24466  196.05534
## 3 2.901800e+02 209.27466  371.08534
## 4 4.571267e+02 376.22133  538.03200
## 5 6.573667e+02 576.46133  738.27200
## 6 9.574867e+02 876.58133 1038.39200
## 7 1.424073e+03 1343.16800 1504.97867
```

Para la realizacion del presente analisis fue utilizado el software R version 3.5.1.

Anexo. Capítulo B. 1 Caracterización de microorganismos mediante el uso del Biolog MicroStation ID Reader

File Name sesion4 Viernes 31 Marzo.DEE
User biolog1
Instrument MicroStation 2 Reader
Instrument S/N 1403197
Incubation Hours 96.00
Plate Number 1
Plate Type FF
Strain Type Filamentous Fungi

Usuario Lilly
Codigo muestra PL020
Origen Biosolidos

Date & Time of Read Mar 31 2017 3:59 PM
Biolog ID DB FF61196.ed

Result Species ID: Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson BGB
Comment
Notice

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.985	0.643	5.334	FF	Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson BGB
2	0.015	0.009	6.752	FF	Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson BGA
3	0.000	0.000	12.116	FF	Eupenicillium javanicum var javanicum (vanBeyma) Stolk & Scott
4	0.000	0.000	12.145	FF	Fusarium melenchlorum (Caspery) Saccardo

Key: <x: positive, x: negative, <x: mismatched positive, x: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well

Well Color Values

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0+	16+	-173	+ < 538	-191	< 147	< 422	-96	29	< 139	< 659	< 167
B	-233	-217	< 168	< 243	< 145	-61	< 158	-248	+ < 182	-16	{ 107	< 191
C	< 729	-220	< 897	< 713	< 283	< 200	< 838	-91	-110	59	< 151	< 270
D	< 148	< 219	< 310	< 227	56	13	< 156	< 170	< 142	80	< 200	< 129
E	< 277	< 764	< 382	< 384	< 404	< 457	< 470	< 266	- < 409	< 609	< 493	< 328
F	< 666	< 1021	< 813	< 639	< 774	< 1133	< 393	< 363	-41	< 676	< 686	< 712
G	< 740	< 198	< 708	< 642	< 333	4	< 774	< 795	< 771	< 710	< 597	< 872
H	< 941	< 1109	< 1225	< 687	< 771	< 859	< 951	< 641	< 1175	< 858	< 542	< 907

Well Turbidity Values

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0+	< 758	+ < 5+	< 3470	67	< 1574	< 534	181	< 941	< 1624	< 1056	< 1999
B	139	112	< 1166	< 1450	< 1694	< 712	< 1813	{ 190	+ < 1645	< 603	< 1194	< 1928
C	< 386	-80	< 1090	< 1694	< 787	< 1581	< 1861	115	88	< 1826	< 1659	< 1691
D	< 1749	< 1779	< 1954	< 2027	< 1064	< 806	< 1544	< 1606	< 1576	< 318	< 1838	< 1130
E	< 1349	< 1013	< 1587	< 1787	< 2458	< 2363	< 2195	< 659	- < 2274	< 2051	< 2554	< 1731
F	< 1466	< 744	< 1230	{ 253	160	< 664	< 365	107	160	< 1426	< 440	< 2770
G	< 1597	< 2448	< 1325	< 1117	< 686	{ 246	{ 248	< 2728	< 2272	< 1662	< 1275	< 1883
H	< 1192	< 634	< 686	< 752	< 861	< 1950	< 757	< 1098	< 2418	< 2698	< 506	< 2114

File Name Sesion2 Lunes 04 de Abril.D5E
 User biolog1
 Instrument MicroStation 2 Reader
 Instrument S/N 1403197
 Incubation Hours 168.00
 Plate Number 1
 Plate Type FF
 Strain Type Filamentous Fungi

Usuario Lilly
 Código muestra Amb7
 Origen Biosólidos

Date & Time of Read Apr 03 2017 11:21 AM
 Biolog ID DB FF61107.eid

Result Species ID: *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg BGE
 Comment
 Notice

Rank	PRDB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.893	0.682	3.556	FF	<i>Fusarium verticillioides</i> (Saccardo) Nirenberg BGE
2	0.066	0.047	4.441	FF	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtendahl Fries BGA
3	0.012	0.008	5.010	FF	<i>Fusarium sambucinum</i> var <i>sambucinum</i> Fuckel
4	0.009	0.006	5.119	FF	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtendahl Fries BGB

Key: <x: positive, x: negative, <x: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well

Well Color Values

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0 +	< 335	-	< 201	< 819	-201	< 425	< 943	< 313	< 564	< 793	< 634	< 681
B	-380	-249	< 275	166	< 467	< 485	< 509	173 +	< 468	< 702	< 361	< 577	
C	< 548	-401	< 868	< 920	< 824	< 749	< 947	-16	-98	< 655	< 583	< 555	
D	< 958	< 523	< 698	< 639	< 574	< 748	< 747	< 669	< 575	8	< 702	< 578	
E	< 762	< 1090	87	< 753	< 738	< 921	< 892	-209	< 719	< 920	< 487	< 767	
F	< 924	< 709	< 864	< 574	< 671	< 1526	< 873	< 852	< 953	< 740	< 731	< 1061	
G	< 976	< 314	< 747	< 735	< 650	-182	< 1020	< 777	< 1076	< 828	< 866	< 1126	
H	< 999	< 1222	< 1355	< 906	< 860	< 983	< 1039	< 849	< 1161	< 381	< 765	148 +	

Well Turbidity Values

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0+	< 696	-	< 1462	3	< 2502	< 1349	< 1512	< 1382	< 1558	< 1352	< 1397
B	88	30	< 723	< 286	< 1374	< 1981	< 1397	< 653	+ < 904	< 930	< 798	< 885
C	< 264	-11	< 888	< 1840	< 936	< 1346	< 976	115	93	< 1723	< 1496	< 1320
D	< 1722	< 1010	< 1520	< 1696	< 1494	< 1677	< 1778	< 1677	< 1400	45	< 1218	< 1470
E	< 1222	< 482	106	< 1741	< 1634	< 1757	< 1147	42	< 2238	< 1622	< 506	< 1680
F	< 1080	< 333	< 840	< 243	< 254	< 1250	< 494	< 270	< 554	< 790	< 589	< 912
G	< 706	< 690	< 656	< 530	< 469	32	< 434	< 837	< 1083	< 547	< 560	< 792
H	< 416	< 1192	< 1618	< 989	< 738	< 707	< 1176	< 1656	< 1251	< 478	192	< 317 +

Program MicroLog 3/5.2.01.35
 Project ML5
 File Name sesion3 Viernes 31 Marzo.D5E
 User biolog1
 Instrument MicroStation 2 Reader
 Instrument S/N 1403197
 Incubation Hours 48.00
 Plate Number 1
 Plate Type GEN III
 Protocol A

Usuario Lily
 Código muestra 6008.1
 Origen Biosólidos

Date & Time of Read Mar 31 2017 2:29 PM
 Biolog ID DB GEN-III_2.7.1.40.15G

Result Species ID: Ochrobactrum intermedium
 Comment
 Notice

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.764	0.764	3.356	GN-Nent	Ochrobactrum intermedium
2	0.330	0.330	3.502	GN-Nent	Ochrobactrum anthropi
3	0.008	0.008	5.739	GN-Nent	Ochrobactrum hiloi
4	0.000	0.000	8.180	GN-Nent	Ochrobactrum grignonense

Key: <x: positive, x: negative, <x: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well

Well Color Values

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	76	{ 155	< 243	< 247	< 234	< 239	< 254	< 258	76	< 295	< 290	- 50
B	59	78	91	94	84	< 264	98	< 225	87	< 291	{ 218	65
C	< 240	< 210	< 224	< 256	104	< 257	< 261	< 238	{ 183	< 298	87	66
D	{ 195	{ 201	< 221	< 228	{ 159	{ 141	{ 166	{ 158	< 262	< 281	< 291	80
E	80	{ 205	< 264	< 250	< 253	< 243	< 243	{ 139	< 259	< 297	{ 243	{ 225
F	{ 172	{ 168	{ 201	< 264	< 232	{ 204	{ 143	{ 187	- { 162	< 300	< 403	< 321
G	59	< 234	{ 133	< 258	< 264	< 270	< 265	< 282	< 219	< 254	< 270	< 277
H	107	< 224	< 228	{ 205	< 224	{ 141	< 242	< 259	{ 144	< 292	< 279	107

Report Date Apr 03 2017 11:44 AM

Program MicroLog 3/5.2.01 35
Project ML5
File Name Bacterias 2.D5E
User biologi
Instrument MicroStation 2 Reader
Instrument S/N 1403197
Incubation Hours 29.00
Plate Number 1
Plate Type GEN III
Protocol A

Usuario Lily
Codigo muestra 4003
Origen Biosolidos
Proyecto
Lugar

Date & Time of Read Mar 24 2017 3:56 PM
Biolog ID DB GEN III_2 7.1.40.15G

Result Species ID: Ochrobactrum anthropi
Comment
Notice

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.920	0.641	4.384	GN-Nent	Ochrobactrum anthropi
2	0.058	0.034	6.156	GN-Nent	Ochrobactrum intermedium
3	0.018	0.009	6.920	GN-Nent	Ochrobactrum lifitici
4	0.004	0.002	7.833	GN-Nent	Ochrobactrum grignonense

Key -x: positive, x: negative, -x: mismatched positive, x: mismatched negative, (x: borderline, -x: less than A1 well

Well Color Values

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	61	(177	< 153	{ 124 +	{ 140	{ 145	< 190	< 195	77	< 275	< 246	43
B	75	87	(110	98	88	< 221	{ 122	{ 175	103	< 269	(146	51
C	< 221	< 182	< 226	< 221	102	< 235	< 252	< 225	{ 163	< 271	56	56
D	(136	(156	< 232	< 212	< 204	- { 120	{ 159	{ 159	{ 168	< 273	< 275	57
E	104	(144	< 243	< 191	< 247	< 222	< 235	{ 130	< 219	< 273	(224	(206
F	< 203	(138	{ 172	< 249	{ 140	{ 151	70	{ 160	95	< 276	< 407	< 257
G	69	< 193	94	< 227	{ 150	< 240	< 192	< 266	{ 155	69	(219	(178
H	89	(131 +	106	106	80	93 +	{ 164	< 251	62	< 270	96	58

Report Date Mar 24 2017 4:12 PM

Program MicroLog 3/5.2.01 35
 Project ML5
 File Name Bacterias 2.D5E
 User biolog1
 Instrument MicroStation 2 Reader
 Instrument S/N 1403197
 Incubation Hours 29.00
 Plate Number 1
 Plate Type GEN III
 Protocol A

Usuario Lilly
 Código muestra 4008.1
 Origen Biosólidos
 Proyecto
 Lugar

Date & Time of Read Mar 24 2017 3:58 PM
 Biolog ID DB GEN-III_2.7.1.40.15G

Result Species ID: Staphylococcus saprophyticus ss saprophyticus
 Comment
 Notice

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.624	0.624	5.405	GP-Coccus	Staphylococcus saprophyticus ss saprophyticus
2	0.126	0.126	6.609	GP-Coccus	Staphylococcus saprophyticus ss bovis
3	0.068	0.068	7.376	GP-Coccus	Staphylococcus pseudintermedius
4	0.059	0.059	7.535	GP-Coccus	Staphylococcus aureus ss aureus

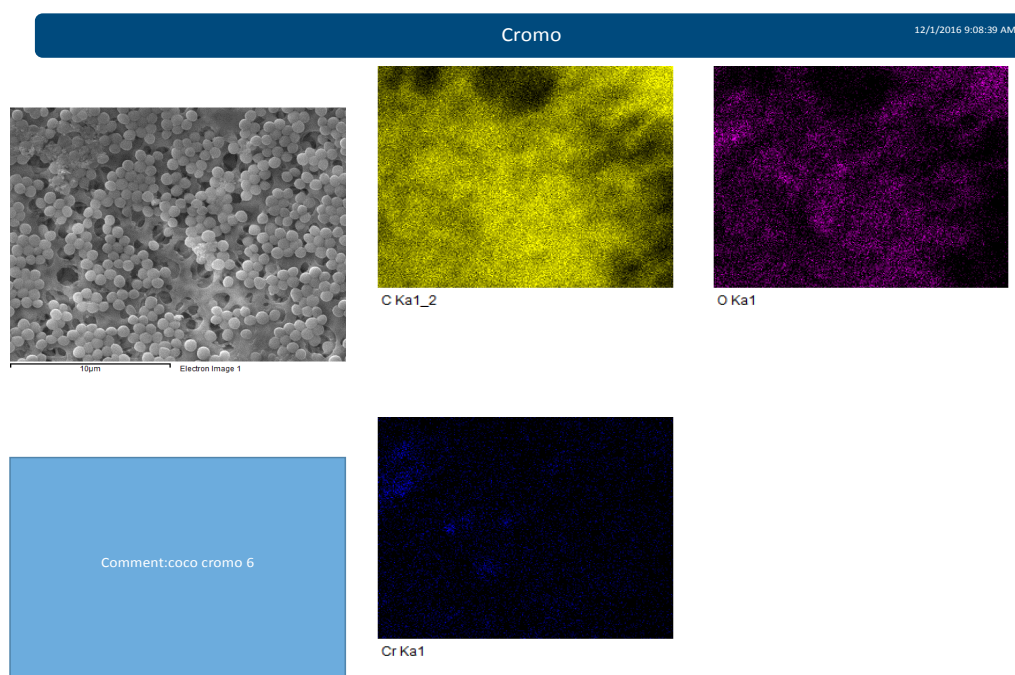
Key: <x: positive, x: negative, <x: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well

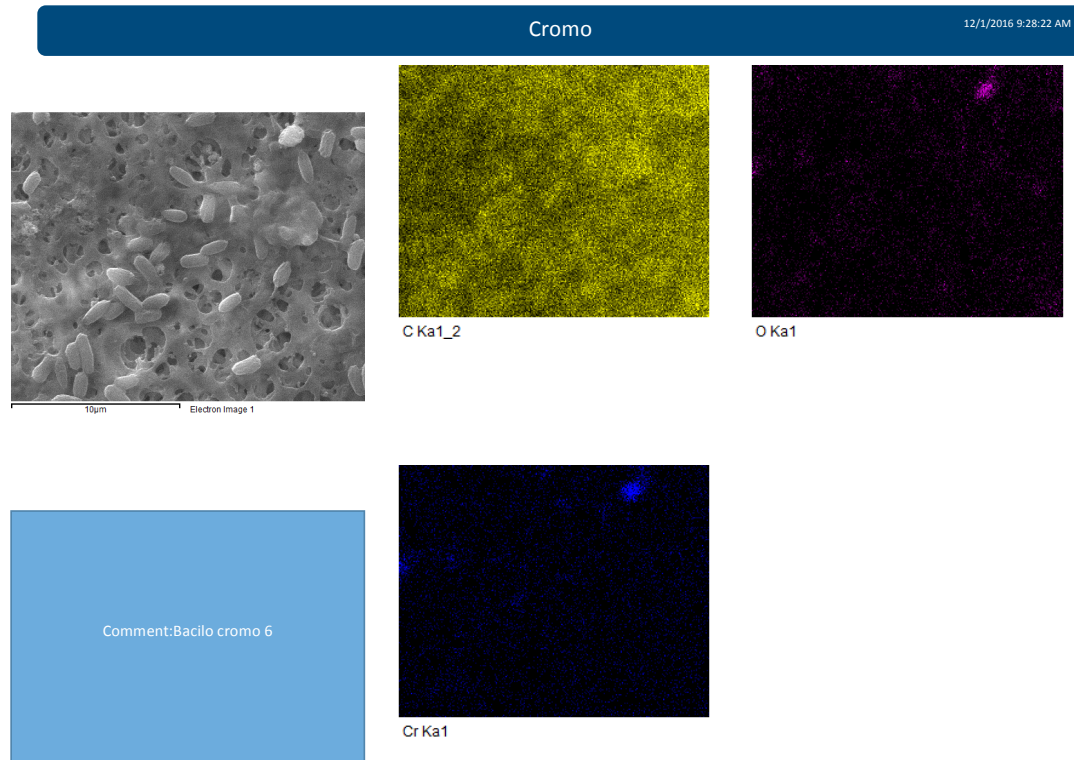
Well Color Values

Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	165	< 255	< 271	< 278	{ 192	{ 187	< 276	< 272	{ 215	< 283	< 281	108
B	172	< 273	{ 195	{ 192	{ 191	< 273	{ 226	{ 211	{ 196	< 250	< 250	< 264
C	< 259	168	< 264	< 270	{ 209	< 233	{ 207	{ 226	< 244	< 255	57	< 282
D	{ 220	< 270	< 249	{ 193	< 265	{ 216	{ 223	{ 209	< 253	< 251	57	59
E	{ 182	< 266	< 253	< 262	< 255	< 258	< 251	{ 225	< 260	< 255	{ 159	57
F	< 261	{ 194	{ 202	< 277	{ 178	{ 181	{ 189	{ 187	{ 190	60	124	93
G	144	< 261	< 236	< 270	< 240	{ 200	158	{ 191	138	< 256	< 247	< 278
H	{ 197	< 257	< 236	158	{ 180	< 253	175	< 258	< 254	< 276	< 254	{ 148

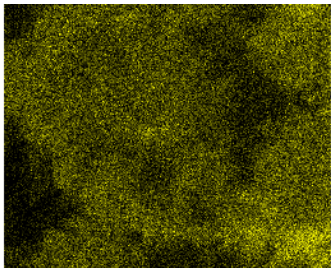
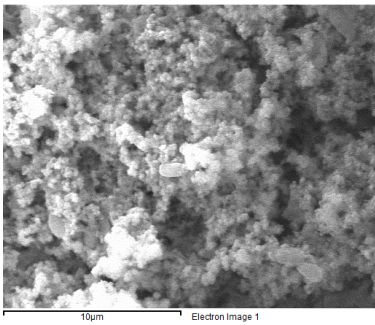
Report Date Mar 24 2017 4:18 PM

Anexo B-2. Pruebas SEM-EDS Microscopio electrónico de barrido sobre *Staphylococcus* y *Bacillus* creciendo en medios de cultivo enriquecido con Cr^{6+} y Cr^{3+} .

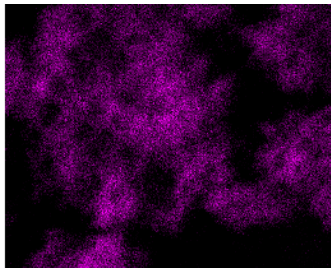




Cromo 12/1/2016 10:17:32 AM

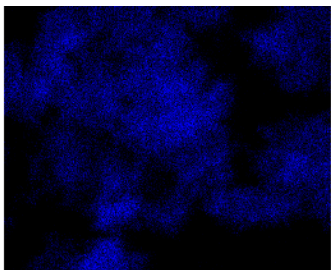


C Ka1_2



O Ka1

Comment: bacilo cromo3



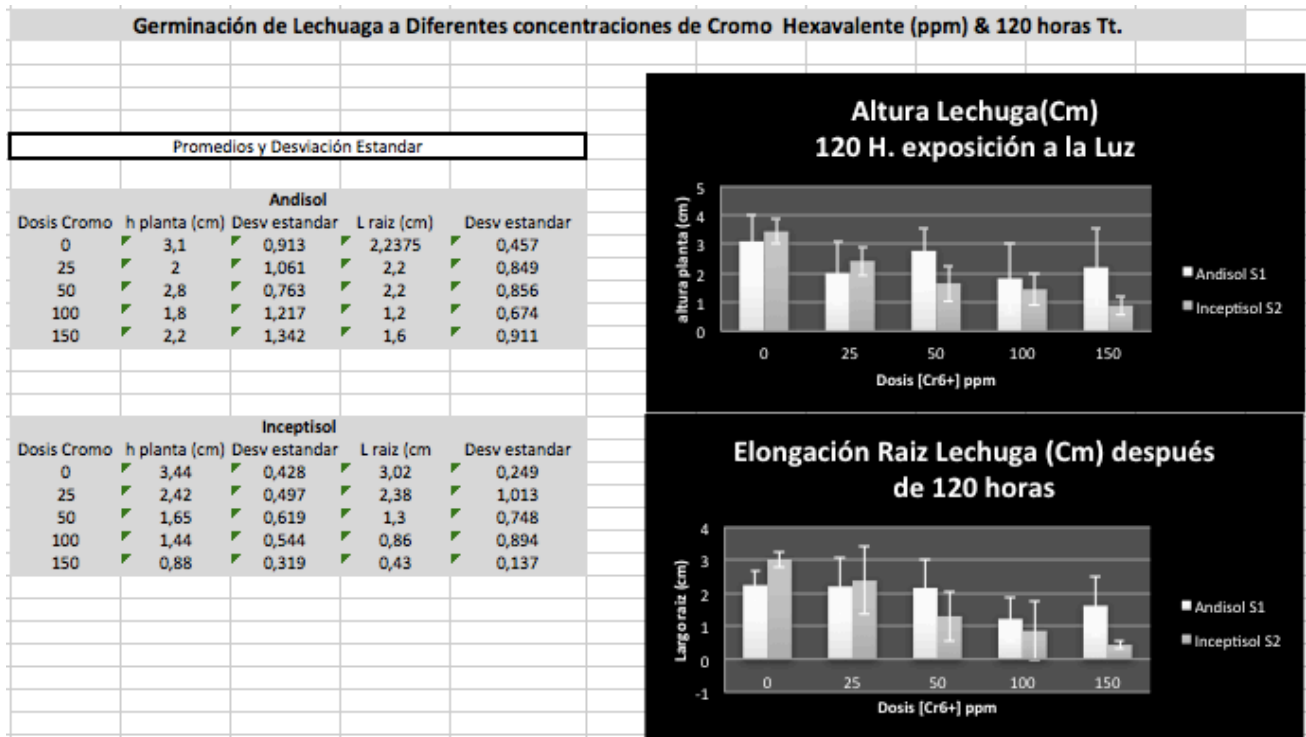
Cr Ka1

Anexo C-1. Reporte estadístico programa SAS procedimiento Mixced, modelo GENMOD.

Ver como documento adjunto Anexo C-1 , reporte estadístico SAS.

Anexo E-1. Prueba de germinación realizada sobre *Lactuca sativa* con diferentes dosis de cromo.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Germinación de Lechuga a Diferentes concentraciones de Cromo Hexavalente (ppm) & 120 horas Tt.										
2											
3	Suelo 1	Andisol	Unidades						Suelo 2	Inceptisol	Unidades
4	D. Aparente	0,43	g cc^-1						D. Aparente	0,83	g cc^-1
5	Peso Suelo	35,00	mg						Peso Suelo	71,00	mg
6	Volumen suelo	81,79	cc						Volumen suelo	85,21	cc
7	V. retenido H2O	5,09	cc						V. retenido H2O	3,10	cc
8	Andisol					Inceptisol					
9	Dosis Cromo	Repetición	h planta (cm)	L raíz(cm)	Exposición Luz	Dosis Cromo	Repetición	h planta cm	L raíz cm	Exposición Luz	
10	0Cr	1	1	2,4	si	0Cr	1	3,5	2,8	si	
11	0Cr	2	3	2	si	0Cr	2	3,8	3,2	si	
12	0Cr	3	3,4	2	si	0Cr	3	3,9	3,2	si	
13	0Cr	4	3,5	3	si	0Cr	4	3	3,2	no	
14	0Cr	5	4	2	no	0Cr	5	3	2,7	no	
15	0Cr	6	2,9	2,5	no	25Cr	1	2,2	1,5	no	
16	0Cr	7	3,5	2,5	no	25Cr	2	1,7	1,5	no	
17	0Cr	8	3,5	1,5	no	25Cr	3	2,7	2	si	
18	25Cr	1	2	1,5	si	25Cr	4	3	3,2	si	
19	25Cr	2	3,5	3,3	si	25Cr	5	2,5	3,7	si	
20	25Cr	3	0,5	1,2	no	50Cr	1	1,2	0,8	no	
21	25Cr	4	2	2,5	si	50Cr	2	1,5	0,5	no	
22	25Cr	5	2	2,5	no	50Cr	3	2,2	1,8	si	
23	50Cr	1	2,5	1,3	no	50Cr	4	2,6	2,4	si	
24	50Cr	2	1,5	1,2	no	50Cr	5	1,4	0,7	no	
25	50Cr	3	2,4	1,7	no	50Cr	6	1	1,6	no	
26	50Cr	4	3	2,1	si	100Cr	1	1,7	0,4	si	
27	50Cr	5	4	2,3	si	100Cr	2	1	0,4	si	
28	50Cr	6	3	3,5	si	100Cr	3	1,2	0,5	si	
29	50Cr	7	3	3	si	100Cr	4	2,5	2,8	si	
30	100Cr	1	2,2	1,8		100Cr	5	1,6	1	si	
31	100Cr	2	1,6	0,9		100Cr	6	1	0,7	no	
32	100Cr	3	1,3	0,6		100Cr	7	1,1	0,2	no	
33	100Cr	4	1,4	0,9		150Cr	1	1,1	0,4		
34	100Cr	5	0,4	0,8		150Cr	2	0,9	0,5		
35	100Cr	6	4	2,3		150Cr	3	1	0,6		
36	150Cr	1	1,9	1,1		150Cr	4	1,2	0,4		
37	150Cr	2	1,1	0,7		150Cr	5	0,3	0,2		
38	150Cr	3	2	1,2		150Cr	6	0,8	0,5		
39	150Cr	4	0,7	1,2							
40	150Cr	5	3,2	2,5							
41	150Cr	6	4,3	3							



Anexo E-2. Reporte estadístico programa R. Evaluación combinada de silicato de magnesio y consorcio microbial mediante el uso del Rhizotron.

Ensayo No.1

```
> # Longitud de raíz ####
> anova=aov(h.raíz~Tratamiento*suelo, data)

> summary(anova)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	3	496.5	165.51	55.377	9.12e-13 ***
suelo	1	2.3	2.30	0.771	0.38649
Tratamiento:suelo	3	40.3	13.43	4.492	0.00968 **
Residuals	32	95.6	2.99		

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> library(phia)

> (mediassuelo=interactionMeans(anova, factors="suelo"))
      suelo adjusted mean std. error
1  Andisol           8.17  0.3865715
2 Inceptisol          7.69  0.3865715

> (mediastratamiento=interactionMeans(anova, factors="Tratamiento"))
Tratamiento adjusted mean std. error
1           1           10.82  0.5466946
2           2           11.97  0.5466946
3           3            3.77  0.5466946
4           4            5.16  0.5466946

> testInteractions(anova, pairwise="suelo", fixed="Tratamiento",
adjust="holm")
F Test:
P-value adjustment method: holm
```

	Value	Df	Sum of Sq	F	Pr(>F)
Andisol-Inceptisol : 1	-1.92	1	9.216	3.0836	0.18412
Andisol-Inceptisol : 2	-1.06	1	2.809	0.9399	0.33959
Andisol-Inceptisol : 3	2.78	1	19.321	6.4646	0.06417 .
Andisol-Inceptisol : 4	2.12	1	11.236	3.7594	0.18412


```
Residuals              32      95.640
```

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
> testInteractions(anova, pairwise="Tratamiento", fixed="suelo",  
adjust="holm")
```

```
F Test:
```

```
P-value adjustment method: holm
```

		Value	Df	Sum of Sq	F	Pr(>F)	
1-2 :	Andisol	-1.58	1	6.241	2.0882	0.5021373	
1-3 :	Andisol	4.70	1	55.225	18.4776	0.0009020	***
1-4 :	Andisol	3.64	1	33.124	11.0829	0.0110124	*
2-3 :	Andisol	6.28	1	98.596	32.9890	1.826e-05	***
2-4 :	Andisol	5.22	1	68.121	22.7925	0.0002679	***
3-4 :	Andisol	-1.06	1	2.809	0.9399	0.6791707	
1-2 :	Inceptisol	-0.72	1	1.296	0.4336	0.6791707	
1-3 :	Inceptisol	9.40	1	220.900	73.9105	8.780e-09	***
1-4 :	Inceptisol	7.68	1	147.456	49.3370	5.231e-07	***
2-3 :	Inceptisol	10.12	1	256.036	85.6666	1.743e-09	***
2-4 :	Inceptisol	8.40	1	176.400	59.0213	9.321e-08	***
3-4 :	Inceptisol	-1.72	1	7.396	2.4746	0.5021373	
Residuals			32	95.640			

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
> # Altura de planta ####
```

```
> anova=aov(h.planta~Tratamiento*suelo, data)
```

```
> summary(anova)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Tratamiento	3	848.2	282.73	55.794	8.25e-13	***
suelo	1	36.5	36.48	7.199	0.0114	*
Tratamiento:suelo	3	13.9	4.62	0.912	0.4460	
Residuals	32	162.2	5.07			

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
> (mediassuelo=interactionMeans(anova, factors="suelo"))
```

```
      suelo adjusted mean std. error
```

```
1      Andisol      12.03  0.5033637
```

```
2 Inceptisol      13.94  0.5033637
```

```
> (mediastratamiento=interactionMeans(anova, factors="Tratamiento"))
```

```
      Tratamiento adjusted mean std. error
```

```
1           1           16.96  0.7118638
```

```
2           2           18.15  0.7118638
```

```
3           3            7.88  0.7118638
```

```
4           4            8.95  0.7118638
```

```
> testInteractions(anova, pairwise="suelo", adjust="holm")
```

```
F Test:
```

```
P-value adjustment method: holm
```

```
Value Df Sum of Sq      F Pr(>F)
Andisol-Inceptisol -1.91  1      36.481 7.199 0.01145 *
Residuals          32     162.160
```

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
> testInteractions(anova, pairwise="Tratamiento", adjust="holm")
```

```
F Test:
```

```
P-value adjustment method: holm
```

```
Value Df Sum of Sq      F      Pr(>F)
1-2      -1.19  1       7.08    1.3972    0.4918
1-3       9.08  1     412.23   81.3482 1.064e-09 ***
1-4       8.01  1     320.80   63.3055 1.325e-08 ***
2-3      10.27  1     527.36 104.0680 8.333e-11 ***
2-4       9.20  1     423.20   83.5126 9.794e-10 ***
3-4      -1.07  1       5.72    1.1296    0.4918
Residuals      32     162.16
```

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
> # Peso seco ####
```

```
> anova=aov(W.seco~Tratamiento*suelo, data)
```

```
> summary(anova)
```

```
              Df      Sum Sq   Mean Sq F value    Pr(>F)
Tratamiento    3 0.0003605 1.202e-04   5.127 0.00521 **
suelo           1 0.0000136 1.357e-05   0.579 0.45225
Tratamiento:suelo 3 0.0000047 1.570e-06   0.067 0.97703
Residuals     32 0.0007500 2.344e-05
```

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
> (mediassuelo=interactionMeans(anova, factors="suelo"))
```

```
      suelo adjusted mean std. error
1 Andisol      0.035470 0.001082549
2 Inceptisol    0.034305 0.001082549
```

```
> (mediastratamiento=interactionMeans(anova, factors="Tratamiento"))
```

```
Tratamiento adjusted mean std. error
1           1      0.03368 0.001530956
2           2      0.03071 0.001530956
3           3      0.03873 0.001530956
4           4      0.03643 0.001530956
```

```
> testInteractions(anova, pairwise="Tratamiento", adjust="holm")
```

```
F Test:
```

```
P-value adjustment method: holm
      Value Df Sum of Sq      F Pr(>F)
1-2    0.00297 1 0.00004410  1.8817 0.539038
1-3   -0.00505 1 0.00012751  5.4404 0.104510
1-4   -0.00275 1 0.00003781  1.6133 0.539038
2-3   -0.00802 1 0.00032160 13.7212 0.004786 **
2-4   -0.00572 1 0.00016359  6.9797 0.063246 .
3-4    0.00230 1 0.00002645  1.1285 0.539038
Residuals      32 0.00075002
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

➤ sink()
```

Ensayo # 2

```
> # Longitud de raíz #####
> anova=aov(h.raíz~Tratamiento*suelo, data)

      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Tratamiento    3     5.8      1.9   1.054    0.381
suelo          1   813.1   813.1 442.647 < 2e-16 ***
Tratamiento:suelo 3    64.5    21.5  11.697 2.02e-05 ***
Residuals     34    62.5     1.8
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

      suelo adjusted mean std. error
1 Andisol      12.44333  0.2966826
2 Inceptisol    3.70750  0.2966826

      Tratamiento adjusted mean std. error
1          1      7.440000  0.4285967
2          2      8.220000  0.4285967
3          3      8.450000  0.4285967
4          4      8.191667  0.3912534
```

```
F Test:
P-value adjustment method: holm
      Value Df Sum of Sq      F Pr(>F)
Andisol-Inceptisol : 1  6.480 1   104.98  57.147 1.770e-08 ***
Andisol-Inceptisol : 2 12.200 1   372.10 202.564 2.785e-15 ***
Andisol-Inceptisol : 3  6.180 1    95.48  51.978 2.428e-08 ***
Andisol-Inceptisol : 4 10.083 1   305.02 166.047 3.665e-14 ***
Residuals          34    62.46
---
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

F Test:

P-value adjustment method: holm

		Value	Df	Sum of Sq	F	Pr(>F)	
1-2 :	Andisol	-3.6400	1	33.124	18.0321	0.001907	**
1-3 :	Andisol	-0.8600	1	1.849	1.0066	0.924521	
1-4 :	Andisol	-2.5533	1	17.780	9.6793	0.033848	*
2-3 :	Andisol	2.7800	1	19.321	10.5180	0.026510	*
2-4 :	Andisol	1.0867	1	3.220	1.7532	0.924521	
3-4 :	Andisol	-1.6933	1	7.820	4.2571	0.280730	
1-2 :	Inceptisol	2.0800	1	10.816	5.8880	0.144879	
1-3 :	Inceptisol	-1.1600	1	3.364	1.8313	0.924521	
1-4 :	Inceptisol	1.0500	1	3.007	1.6369	0.924521	
2-3 :	Inceptisol	-3.2400	1	26.244	14.2867	0.006664	**
2-4 :	Inceptisol	-1.0300	1	2.893	1.5751	0.924521	
3-4 :	Inceptisol	2.2100	1	13.320	7.2513	0.087347	.
Residuals			34	62.456			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> # Altura de planta ####
```

```
> anova=aov(h.planta~Tratamiento*suelo, data)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Tratamiento	3	198.3	66.11	3.292	0.03217	*
suelo	1	246.3	246.26	12.262	0.00131	**
Tratamiento:suelo	3	33.5	11.17	0.556	0.64769	
Residuals	34	682.8	20.08			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

suelo adjusted mean std. error

1 Andisol	16.91917	0.9809912
2 Inceptisol	12.17333	0.9809912

Tratamiento adjusted mean std. error

1	1	11.320	1.417170
2	2	13.800	1.417170
3	3	16.340	1.417170
4	4	16.725	1.293693

F Test:

P-value adjustment method: holm

	Value	Df	Sum of Sq	F	Pr(>F)	
Andisol-Inceptisol	4.7458	1	235.02	11.702	0.001641	**
Residuals		34	682.85			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

F Test:

P-value adjustment method: holm

	Value	Df	Sum of Sq	F	Pr(>F)
1-2	-2.480	1	30.75	1.5312	0.64093
1-3	-5.020	1	126.00	6.2738	0.08605 .
1-4	-5.405	1	159.35	7.9343	0.04812 *
2-3	-2.540	1	32.26	1.6062	0.64093
2-4	-2.925	1	46.67	2.3236	0.54668
3-4	-0.385	1	0.81	0.0403	0.84218
Residuals		34	682.85		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> # Peso seco ####
```

```
> anova=aov(W.seco~Tratamiento*suelo, data)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	3	0.00341	0.001136	0.615	0.609952
suelo	1	0.02944	0.029442	15.942	0.000331 ***
Tratamiento:suelo	3	0.00269	0.000897	0.485	0.694616
Residuals	34	0.06279	0.001847		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	suelo	adjusted mean	std. error
1 Andisol	0.2504292	0.009407139	
2 Inceptisol	0.1984883	0.009407139	

	Tratamiento	adjusted mean	std. error
1	1	0.215080	0.01358984
2	2	0.218530	0.01358984
3	3	0.239200	0.01358984
4	4	0.225025	0.01240577

Ensayo # 3

```
> # Longitud de raíz ####
```

```
> anova=aov(h.raíz~Tratamiento*suelo, data)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	3	98.46	32.82	8.029	0.000275 ***
suelo	1	55.45	55.45	13.564	0.000698 ***
Tratamiento:suelo	3	26.91	8.97	2.194	0.104105
Residuals	39	159.42	4.09		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

suelo adjusted mean std. error

1	Andisol	11.55667	0.4328464
2	Inceptisol	9.34881	0.4052662

Tratamiento adjusted mean std. error

1	1	11.425000	0.5836500
2	2	12.114286	0.5919291
3	3	9.796667	0.6121373
4	4	8.475000	0.5836500

F Test:

P-value adjustment method: holm

	Value	Df	Sum of Sq	F	Pr(>F)
Andisol-Inceptisol	2.2079	1	56.674	13.864	0.0006199 ***
Residuals		39	159.423		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

F Test:

P-value adjustment method: holm

	Value	Df	Sum of Sq	F	Pr(>F)
1-2	-0.6893	1	2.811	0.6875	0.4120460
1-3	1.6283	1	15.151	3.7065	0.1845495
1-4	2.9500	1	52.215	12.7735	0.0047773 **
2-3	2.3176	1	30.281	7.4078	0.0386253 *
2-4	3.6393	1	78.347	19.1662	0.0005225 ***
3-4	1.3217	1	9.982	2.4419	0.2524313
Residuals		39	159.423		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> # Altura de planta ####
```

```
> anova=aov(h.planta~Tratamiento*suelo, data)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	3	102.4	34.13	2.260	0.09662 .
suelo	1	135.9	135.89	9.000	0.00469 **
Tratamiento:suelo	3	96.8	32.28	2.138	0.11105
Residuals	39	588.9	15.10		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

suelo adjusted mean std. error

1	Andisol	22.76250	0.8319027
2	Inceptisol	19.30714	0.7788953

Tratamiento adjusted mean std. error

1	1	22.65833	1.121737
2	2	21.52429	1.137649
3	3	21.33167	1.176488
4	4	18.62500	1.121737

F Test:

P-value adjustment method: holm

	Value	Df	Sum of Sq	F	Pr(>F)
Andisol-Inceptisol	3.4554	1	138.81	9.1931	0.004303 **
Residuals		39	588.88		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

F Test:

P-value adjustment method: holm

	Value	Df	Sum of Sq	F	Pr(>F)
1-2	1.1340	1	7.61	0.5038	1.00000
1-3	1.3267	1	10.06	0.6661	1.00000
1-4	4.0333	1	97.61	6.4642	0.09054 .
2-3	0.1926	1	0.21	0.0139	1.00000
2-4	2.8993	1	49.72	3.2931	0.38634
3-4	2.7067	1	41.86	2.7725	0.41565
Residuals		39	588.88		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Anexo E-3. Datos originales ensayos 1-2-3 Evaluación combinada de silicato de magnesio y consorcio microbial mediante el uso del Rhizotron

Crecimiento de raíz y altura de la planta de *L. culinaris* en presencia de Cr^{6+} y de los microorganismos *Ochrobactrum anthropi* y *Trichoderma* sp. (S1= Andisol; S2= Inceptisol).

Tratamiento	Suelo	Replica	Largo raíz (cm)	Altura planta (cm)	Peso total húmedo (g)	Peso seco (15 días a T ambiente)
1	S1	1	9,6	16,2	0,1432	0,029
1	S1	2	8,1	13,5	0,1713	0,0324
1	S1	3	11,8	18,8	0,1839	0,0346
1	S1	4	11,1	16,5	0,1663	0,0379
1	S1	5	8,7	17,8	0,1912	0,0373
1	S2	1	12,5	19,5	0,15	0,0328
1	S2	2	12,1	19,3	0,1235	0,0409
1	S2	3	14,1	18,2	0,202	0,0241
1	S2	4	13	11,8	0,1999	0,0306
1	S2	5	7,2	18	0,157	0,0372
2	S1	1	7	12	0,1178	0,0336
2	S1	2	13,7	18,7	0,1359	0,0266
2	S1	3	12,1	18,8	0,1592	0,0396
2	S1	4	11,8	17,6	0,1836	0,0278
2	S1	5	12,6	15,5	0,1315	0,0303
2	S2	1	12	18,9	0,1141	0,0279
2	S2	2	13	18,1	0,1105	0,0284
2	S2	3	12,2	20	0,1444	0,0307
2	S2	4	12,7	20,7	0,1768	0,0289
2	S2	5	12,6	21,2	0,1518	0,0333
3	S1	1	3,8	6,8	0,1643	0,0392
3	S1	2	4,3	5,5	0,1702	0,0412
3	S1	3	4,5	8	0,1577	0,0396
3	S1	4	7,5	8,4	0,1884	0,0435
3	S1	5	5,7	9	0,1815	0,0303
3	S2	1	2,6	6,5	0,1756	0,0366
3	S2	2	2,2	9,6	0,1778	0,0395
3	S2	3	1,8	9,2	0,1732	0,0391
3	S2	4	2,4	7,2	0,1816	0,0406
3	S2	5	2,9	8,6	0,1651	0,0377
4	S1	1	8,8	4,5	0,142	0,045
4	S1	2	6	9,8	0,1988	0,0313
4	S1	3	3,5	5	0,1651	0,0379
4	S1	4	5,2	10,9	0,1902	0,0406
4	S1	5	7,6	7,3	0,2039	0,0317
4	S2	1	4,8	12,5	0,2553	0,03
4	S2	2	2,5	13	0,1878	0,0393
4	S2	3	4,5	9	0,2085	0,0446
4	S2	4	4,1	8	0,1715	0,0311

4	S2	5	4,6	9,5	0,1571	0,0328
---	----	---	-----	-----	--------	--------

Ensayo No. 2. Peso y largo de raíz y altura de la planta de *L. culinaris* en presencia de Cr⁶⁺, silicato de magnesio y los microorganismos *Ochrobactrum anthropi*, *Bacillus cereus*, *Scedosporium dehoogii* y *Trichoderma* sp.

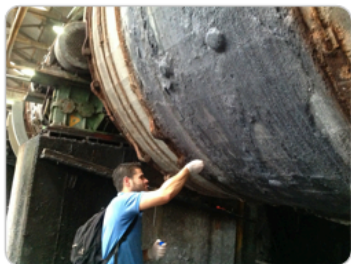
Tratamiento	Suelo	Replica	Largo raíz (cm)	Altura planta (cm)	Peso húmedo (g)
1	1	1	7,5	7,8	0,2078
1	1	2	9,9	6	0,2171
1	1	3	11,9	16,1	0,2149
1	1	4	11,1	17,6	0,2495
1	1	5	13	19,4	0,2698
1	2	1	2,9	7	0,1726
1	2	2	5,8	9	0,1882
1	2	3	2,9	9,2	0,1856
1	2	4	5,7	8,1	0,2303
1	2	5	3,7	13	0,215
2	1	1	14,5	14,1	0,3359
2	1	2	14,4	18	0,2343
2	1	3	14,5	12	0,1873
2	1	4	13,5	17,4	0,1731
2	1	5	14,7	12,9	0,2638
2	2	1	3,2	18,5	0,1565
2	2	2	2,5	13,2	0,2168
2	2	3	0,9	5	0,1649
2	2	4	1,9	10,9	0,23
2	2	5	2,1	16	0,2227
3	1	1	12,2	22,5	0,2614
3	1	2	7	9,8	0,2448
3	1	3	13,2	21,2	0,2553
3	1	4	12,6	20,1	0,2937
3	1	5	12,7	22,9	0,2918
3	2	1	5,7	9,8	0,2126
3	2	2	5	8,2	0,1753
3	2	3	6,2	17,5	0,2214
3	2	4	5,1	15,5	0,1597
3	2	5	4,8	15,9	0,276
4	1	1	12,3	18,8	0,1995
4	1	2	14,3	24	0,2608
4	1	3	12,9	21,5	0,2484
4	1	4	13,8	22,6	0,2921
4	1	5	12,7	22,9	0,2158
4	1	6	13,4	10,9	0,3531
4	2	1	3,8	17,5	0,2006
4	2	2	3,9	10	0,2156
4	2	3	3,1	10,2	0,1912
4	2	4	2,9	16,2	0,1245
4	2	5	3,1	9,2	0,2496
4	2	6	2,1	16,9	0,1491

Ensayo No. 3. Largo de raíz y altura de *L. culinaris* en presencia Cr^{6+} , biosólido, y de Silicato de Magnesio, y los microorganismos *Ochrobactrum anthropi*, *Bacillus cereus*, *Scedosporium dehoogii* y *Trichoderma* sp.

Tratamiento	Suelo	replica	Largo raíz (cm)	Altura planta (cm)
1	1	1	13	25
1	1	2	13	21,5
1	1	3	12,5	16,8
1	1	4	10,6	23
1	1	5	11,7	25
1	1	6	11,7	24
1	2	1	11,6	23,7
1	2	2	8,9	23,4
1	2	3	12,3	21,5
1	2	4	10,8	21
1	2	5	8,6	21
1	2	6	12,4	26
2	1	1	13,2	27
2	1	2	11,9	25
2	1	3	12,1	23,5
2	1	4	10,5	18,9
2	1	5	13,3	17,2
2	2	6	13,9	25,9
2	2	1	12,5	23,9
2	2	2	12,9	23
2	2	3	13	21,4
2	2	4	10,2	20,4
2	2	5	8,8	7,5
2	2	6	12,9	23
3	1	1	13,1	24,9
3	1	2	12,5	25
3	1	3	12,5	25,5
3	1	4	8,5	23
3	1	5	12,2	22,5
3	2	1	6,3	24,1
3	2	2	8,4	15,8
3	2	3	10,5	19,5
3	2	4	13,2	19,7
3	2	5	1,5	15,2
3	2	6	7,1	16,6
4	1	1	7	20,8
4	1	2	10,9	23,4
4	1	3	10,4	22,5
4	1	4	11,8	20
4	1	5	10,4	20,7
4	1	6	10,6	24,6
4	2	1	8	14,5
4	2	2	8,4	23,5
4	2	3	6	13,6
4	2	4	6,6	11,6
4	2	5	4,6	8,5
4	2	6	7	19,8

Otros Anexos. F-1 Infográfico. Recuento cronológico.

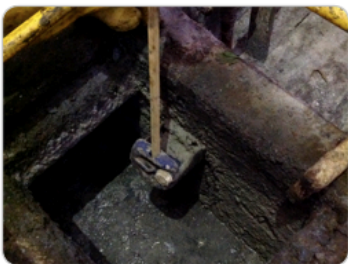
Infografía Proyecto Doctoral	Plancha 1	Colección muestras y estandarización	Plancha 3	Materiales promisorios
	Plancha 2	Preparación medios de cultivo	Plancha 4	Pruebas de invernadero



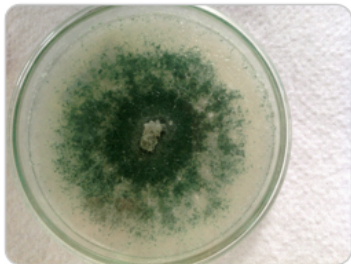
Bufón: curtido de piles con sales de Cromo (Curtiembre Itagui)



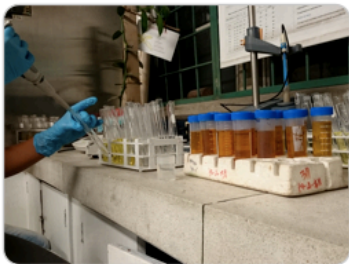
Cárcamo Colector Final: proceso que recoge todas las aguas con residuos de cromo antes de entregar a EPM



Planta de recuperación: Proceso para reciclar cromo antes del vertido final



Trichoderma sp. Cepa de La universidad, no tan virulenta como el caracterizado en la SIU y nativo del biosólido



Proceso de diluciones seriadas. estandarización de métodos



Procedimiento para evaluar el método de la difenilcarbazida para detectar presencia de cromo 6+

Infografía Proyecto Doctoral	Plancha 1	Colección muestras y estandarización	Plancha 3	Materiales promisorios
	Plancha 2	Preparación medios de cultivo	Plancha 4	Pruebas de invernadero


Ensayo con 3 medios en hongo 5001

- Se usaron los medios líquidos PDB (papa-dextrosa); GYB (glucosa, extracto levadura, extracto malta) y el TSB o CASO (caseína y soya).
- Se dejaron en agitación a 90 rpm T° ambiente por 72 horas



Preparación de diferentes medios de cultivo

Caldo nutritivo 800 ppm Cr



0 horas 800 con biosólido (neg) sin biosólido (dere)

24 horas 800 con biosólido (dere) sin biosólido (neg)

48 horas 800 con biosólido (dere) sin biosólido (neg)

Enriquecimiento del medio nutritivo con dicromato de potasio

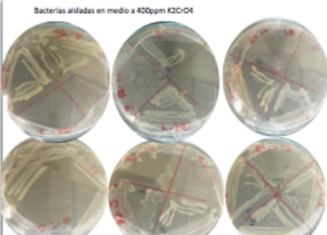
Agar nutritivo pH después del autoclave con Cr



Se observa cambio de color, sin embargo el pH sigue en el rango entre 5-6

Control de pH de los diferentes medios de crecimiento

Bacterias aisladas en medio a 450ppm K2CrO4



Aislamientos Bacteriales

Bacterias



- Fueron conservadas con éxito en glicerol al 20% a -20°C.
- Hasta ahora presentan resultados positivos en adaptación en 100 ppm de Cr.
- Esta se seguirá aumentando hasta que sean inhibidas.

Buscando la concentración mínima inhibitoria

Biosorbente	Capacidad de adsorción (mg/g)	Referencias
<i>Aspergillus foetidus</i>	2	Prasanthi y Sumathi (200)
<i>Aspergillus niger</i>	117.33	Khamohaty et al. (2009)
<i>Aspergillus sydowii</i>	1.76	Kumar et al. (2008)
<i>Rhizopus nigricans</i>	47	Bai y Abraham (2001)
<i>Rhizopus oligosporus</i>	126	Arif et al. (1999)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	11	Bai y Abraham (1996)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	78	Aksoy y Balbek (2007)
<i>Rhizopus sp.</i>	4.33	Zafar et al. (2007)
<i>Mucor hiemalis</i>	53.5	Tewari et al. (2005)
<i>Penicillium sp.</i>	1000	(presente estudio)
<i>Bacillus coagulans</i>	39.9	Srinath et al. (2002)
<i>Bacillus megaterium</i>	30.7	Srinath et al. (2002)
<i>Zoogloea ramigera</i>	2	Nourbakhsh et al. (1994)
<i>Streptomyces noursei</i>	1.2	Martuschna y Straube (19)
<i>Clonostachys vulgaris</i>	3.5	Nourbakhsh et al. (1994)
<i>Candidophora orisipale</i>	3	Nourbakhsh et al. (1994)
<i>Dumaliella sp.</i>	58.3	Dommez y Aksoy (2002)
<i>Pachymyces sp.</i>	225	Lee et al. (2000)

Microorganismos reportados por algunos autores remediando cromo en distintas concentraciones

Infografía Proyecto Doctoral	Plancha 1	Colección muestras y estandarización	Plancha 3	Materiales promisorios
	Plancha 2	Preparación medios de cultivo	Plancha 4	Pruebas de invernadero

8001

- Mostró crecimiento en 1000 ppm de Cr el 12-11-2015
- Morfología cambia en medio sin Cr 19-02-2016
- Durante reactivación iniciada el 9-03-2016 en 200 Cr presento buen crecimiento

Cepa fúngica 8001 creciendo desde 200 hasta 1000 ppm de cromo 6+

8002

- Presentó tolerancia en 1000ppm Cr en el 12-11-2015
- Muestra crecimiento prolifero 200ppm durante activación 4-03-2016
- Cambia su morfología en medio sin Cr 19-02-2016

Cambios por posible adaptación de la cepa al crecer en medio con cromo. Seleccionado para el consorcio

5001

- Logró crecer sin adaptación alguna en M M L 5 0 0 Cr 24-02-2016.
- Presenta una buena respuesta al método de adaptación. 200-400 ppm Cr 4 y 22-03-2016 respectivamente.
- Hay un leve cambio en su morfología con respecto al medio sin Cr 19-02-2016

Elegido para secuenciación molecular en la SIU. Caracterizado *Trichoderma* cercano a *cerinum*

6005

- Presenta morfología diferente en medio sin Cr
- Tiene una respuesta positiva a los aumentos en la concentración de Cr 400ppm
- La máxima tolerancia alcanzada han sido 700ppm Cr

Material promisorio futuros ensayos o caracterizaciones

Natural control

- Presentó crecimiento en medio con 800ppm Cr
- Tiene buena respuesta al método de adaptación 200 Cr
- 400 ppm Cr

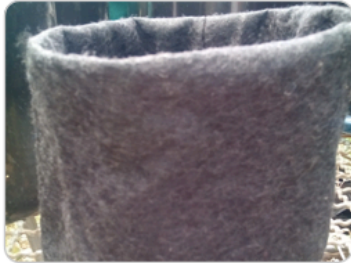
Cepa de *Paecilomyces* suministrada por Natural Control

5004

- Presento un cambio significativo desde el cultivo inicial en medio sin Cr
- A pesar de no estar presentando una buena respuesta al método de adaptación, aun sigue creciendo 200 ppm Cr
- Llego a crecer a 600 ppm Cr morfología presenta cambios
- Últimas adaptaciones 500 Cr bajo crecimiento

Posible *Aspergillus*, cambios morfológicos de adaptación al medio con cromo

Infografía Proyecto Doctoral	Plancha 1	Colección muestras y estandarización	Plancha 3	Materiales promisorios
	Plancha 2	Preparación medios de cultivo	Plancha 4	Pruebas de invernadero



Detalle de la Confección del Rizopot Geotextil Payco # 1800 para separar rizósfera del suelo solo



Macetas conteniendo el Rizopot en suelo Tipo Andisol y adición de biosólido, cromo 6+ y microorganismos



Macetas con suelo Inceptisol y frijol de 15 días de germinado. Rizopot separando del volumen de suelo normal



Lixiviado s tratamientos que tenían adición de 1200 mg.kg-1 de Cr 6+ al llevarlo a capacidad de campo



Detalle de los platos recolectores de lixiviados



Vista general del experimento y el invernadero de la Universidad Nacional sede Medellín.

Infografía Proyecto Doctoral	Plancha 1		Plancha 3	
	Plancha 2		Plancha 5	Varias Inicio proyecto

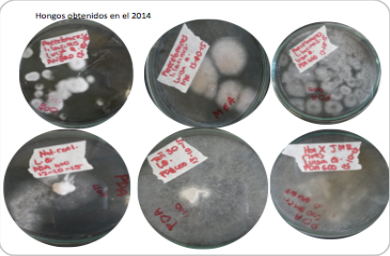


Foto 1: Hongos promisorios obtenidos en 2014

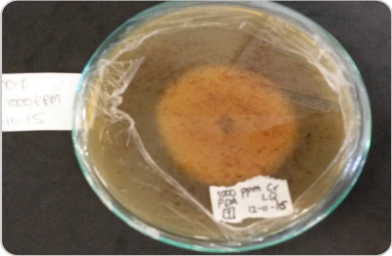


Foto 2: Aislado de Biosólidos, creciendo en 1000 ppm de Cromo. Sin caracterizar

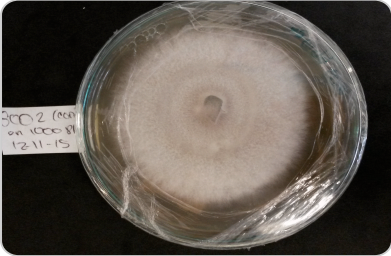


Foto 3: Aislado como contaminante, de una caja Petri creciendo ahora en 1000 ppm de cromo. Sin caracterizar



Foto 4: biosólido Ptar San Fernando + Agua Destilada 1:2 para determinar pH del sobrenadante

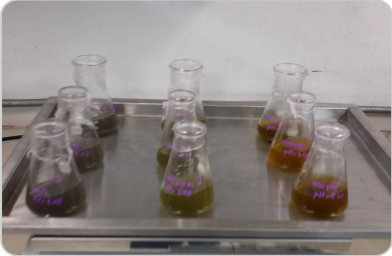


Foto 5 : Isotermas de adsorción de Cr. 1 gr de Biosólido < 0,5 mm + diluciones de solución 1000 ppm de Cr⁺⁶

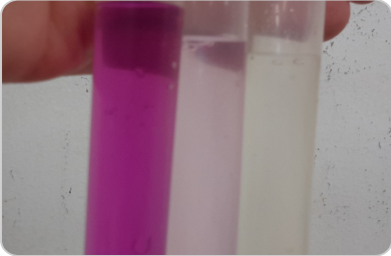


Foto 6: Protocolo EPA 7196 A para determinar Cr⁺⁶ en presencia de Difenil-carbazida

Infografía Proyecto Doctoral	Plancha 1		Plancha 3	
	Plancha 2		Plancha 5	Construcción Rhizotron

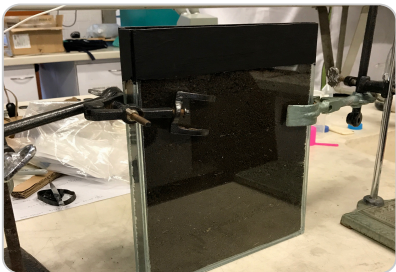


Foto 1 : Detalle Exterior
Rhizotron de un Cuerpo

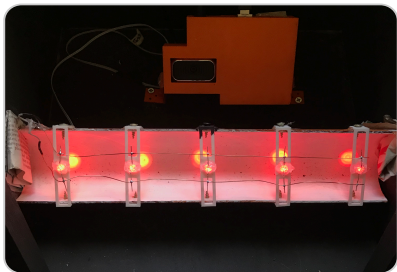


Foto 2: Luz Roja Interior sobre caja
portadora negra totalmente

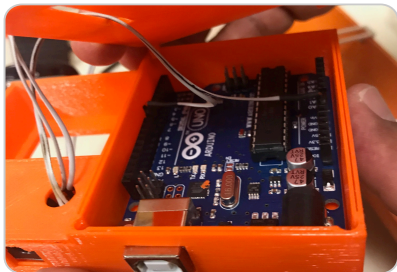


Foto 3: Interfaz y arduino
Música: "Ipsum Dolor"



Foto 4 : Cámara Web HD
Microsoft HD 3000

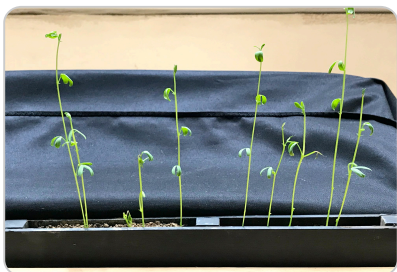


Foto 5: Detalle de los dos cuerpos o
tabiques separados para cada suelo



Foto 6: Rhizotrones en línea
Software MedusaRhizo.

REFERENCIAS

- Acevedo, F. ; Espinosa, A. ; Rodríguez I, Rivera, M. ; Ávila, M. ; Wrobel ,K. ; Lappe, P.; Ulloa, M. ; Gutiérrez, J. (2006). Hexavalent chromium removal in Vitro and from industrial wastes, using chromate resistant strains of filamentous fungi indigenous to contaminated wastes. *Can. J. Microbiol.* 52 (9), 809-815.
- Achal, V., Kumari, D., & Pan, X. (2011). Bioremediation of Chromium Contaminated Soil by a Brown-rot Fungus, *Gloeophyllum sepiarium*. *Research Journal of Microbiology*, 6(2), 166–171. <https://doi.org/10.3923/jm.2011.166.171>
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1998) Toxicological Profile for Chromium. U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.
- Ahluwalia, S. S., & Goyal, D. (2013). Microbial Waste Biomass for Removal of Chromium(VI) from Chrome Effluent. *Bioremediation Journal*, 17(3), 190–199. <https://doi.org/10.1080/10889868.2013.807770>
- Ahmed, E., Abdulla, H. M., Mohamed, A. H., & El-Bassuony, A. D. (2016). Remediation and recycling of chromium from tannery wastewater using combined chemical–biological treatment system. *Process Safety and Environmental Protection*, 104, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.08.004>
- Akram, M., Bhatti, H. N., Iqbal, M., Noreen, S., & Sadaf, S. (2017). Biocomposite efficiency for Cr(VI) adsorption: Kinetic, equilibrium and thermodynamics studies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(1), 400–411. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.12.002>
- Amorena, A. (1995). Plan integral de reutilización de los lodos de la depuradora de la comarca de Pamplona. Gestión y utilización de residuos urbanos para la Agricultura. Barcelona: Fundación la Caixa, pp. 45-53.
- Alekhyia Iyengar, C., & Subbaiah Usha, M. (2016). Removal of chromium by *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* strain 1. *Biologija*, 62(1). <https://doi.org/10.6001/biologija.v62i1.3285>
- Apte, A. D., Verma, S., Tare, V., & Bose, P. (2005). Oxidation of Cr(III) in tannery sludge to Cr(VI): Field observations and theoretical assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 121(1–3), 215–222. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2005.02.010>
- Aruoja, V. Kahru, A., Dubourguier, H. (2008). Toxicity of ZnO, TiO₂ and CuO nanoparticles to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Toxicology Letters*, 180 (1) p 220.
- Asatiani, N. V., Abuladze, M. K., Kartvelishvili, T. M., Bakradze, N. G., Sapojnikova, N. A., Tsibakhashvili, N. Y., ... Holman, H.-Y. (2004). Effect of Chromium(VI) Action on *Arthrobacter oxydans*. *Current Microbiology*, 49(5), 321–326. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4351-2>
- Avudainayagam, S., Megharaj, M., Owens, G., Kookana, R. S., Chittleborough, D., & Naidu, R. (2003). Chemistry of Chromium in Soils with Emphasis on Tannery Waste Sites (pp. 53–91). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-21728-2_3
- Azmat, R., & Khanum, R. (2005). Effect of Chromium Metal on the Uptakes of Mineral Atoms in Seedlings of Bean Plant *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(2), 281–283. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2005.281.283>

- Bachate, S. P., Nandre, V. S., Ghatpande, N. S., & Kodam, K. M. (2013). Simultaneous reduction of Cr(VI) and oxidation of As(III) by *Bacillus firmus* TE7 isolated from tannery effluent. *Chemosphere*, 90(8), 2273–2278. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.081>
- Balls, M., Fentem, J., Joooint, E. (1992). Animal Experiments. Hobson Publishing, Cambridge. 2-15.
- Bartlett, R., & James, B. (1979). Behavior of Chromium in Soils: III. Oxidation1. *Journal of Environment Quality*, 8(1), 31. <https://doi.org/10.2134/jeq1979.00472425000800010008x>
- Bedoya-Urrego, K., Acevedo-Ruíz, J. M., Peláez-Jaramillo, C. A., & Del Pilar Agudelo-López, S. (2013). Caracterización de biosólidos generados en la planta de tratamiento de agua residual San Fernando, Itagüí (Antioquia, Colombia) The characterization of biosolids produced by the San Fernando wastewater treatment plant in Itagui, Antioquia, Colombia. *Rev. Salud pública. Enviado Para Modificación*, 15(22), 778–790. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rsap/v15n5/v15n5a13.pdf>
- Beltrán-Pineda, M. E., & Gómez-Rodríguez, A. M. (2016). Biorremediación de Metales Pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg), Mecanismos Bioquímicos e Ingeniería Genética: Una Revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 172–197. <https://doi.org/10.18359/RFCB.2027>
- Bharagava, R. N., & Mishra, S. (2018). Hexavalent chromium reduction potential of *Cellulosimicrobium* sp. isolated from common effluent treatment plant of tannery industries. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.040>
- Bhattacharya, A., Gupta, A., Kaur, A., & Malik, D. (2014). Efficacy of *Acinetobacter* sp. B9 for simultaneous removal of phenol and hexavalent chromium from co-contaminated system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(23). <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5910-5>
- Bielefeldt, A. R., & Vos, C. (2014). Stability of biologically reduced chromium in soil. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.012>
- Bishop, M. E., Glasser, P., Dong, H., Arey, B., & Kovarik, L. (2014). Reduction and immobilization of hexavalent chromium by microbially reduced Fe-bearing clay minerals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 133, 186–203. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2014.02.040>
- Brose, D. A., & James, B. R. (2008a). Oxidation-Reduction Transformations of Chromium in Electron-Shuttling Quinones in Chemical and Microbiological pathways, (Vi).
- Brose, D. A., & James, B. R. (2008b). Title of Thesis: Oxidation-reduction transformations of chromium in aerobic soils and the role of electron-shuttling quinones in chemical and microbiological pathways.
- Bulich, A., (1979). Use of luminiscent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. *Aquatic Toxicology*. ASTM 667. L. L. Markings y R. A. Kimerle (Eds.). American Society for Testing Materials. 98-106.
- Bulich, A. (1988) Analytical application of the MICROTOX system. Analytical Techniques and Residuals Management. Conference En: ___WaterPollutionControlFederationSpecialty.19-20.Atlanta
- Busch, J., Mendelssohn, I. A., Lorenzen, B., Brix, H., & Miao, S. (2006). A rhizotron to study root growth

- under flooded conditions tested with two wetland Cyperaceae. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 201(6), 429–439. <https://doi.org/10.1016/J.FLORA.2005.08.007>
- Cala, V., Cases, M. A., & Walter, I. (2005). Biomass production and heavy metal content of *Rosmarinus officinalis* grown on organic waste-amended soil. *Journal of Arid Environments*, 62(3), 401–412. <https://doi.org/10.1016/J.JARIDENV.2005.01.007>
- Calleja, M. ; Persoone, G. (1992). The potential of ecotoxicological tests for prediction of acute toxicity in man as avaluates on the first ten chemicals of the MEIC programme. 20 (3), 396-405.
- Cárdenas-González, J. F., Martínez-Juárez, V. M., & Acosta-Rodríguez, I. (2011). Remoción de Cromo (VI) por una Cepa de *Paecilomyces* sp Resistente a Cromato. *Información Tecnológica*, 22(4), 43–50. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642011000400006>
- Cervantes, C., & Campos-García, J. (2007). Reduction and Efflux of Chromate by Bacteria. In *Molecular Microbiology of Heavy Metals* (pp. 407–419). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/7171_2006_087
- Chaney, R, y Giordano, P. (1977). Microelements as related to plant deficiencies and toxicities.
- Charrier, T., Durand, M., Affi, M., Jouanneau, S., Gezekel, H., Thouand, G., (2006). Bacterial Bioluminescent Biosensor Characterisation for On-line Monitoring of Heavy Metals Pollutions *Waste Water Treatment Plant Effluents*. University of Nantes. Department of Biology. Francia.
- Cheng, Y., Yan, F., Huang, F., Chu, W., Pan, D., Chen, Z., ... Wu, Z. (2010). Bioremediation of Cr (VI) and Immobilization as Cr (III) by *Ochrobactrum anthropi*. *Environmental Science & Technology*, 44(16), 6357–6363. <https://doi.org/10.1021/es100198v>
- Choong, C. E., Ibrahim, S., Yoon, Y., & Jang, M. (2018). Removal of lead and bisphenol A using magnesium silicate impregnated palm-shell waste powdered activated carbon: Comparative studies on single and binary pollutant adsorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 142–151. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2017.10.025>
- Coleman, R. N., & Qureshi, A. A. (1985). Microtox® and *Spirillum volutans* tests for assessing toxicity of environmental samples. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 35(1), 443–451. <https://doi.org/10.1007/BF01636536>
- Coreño-Alonso, A., Solé, A., Diestra, E., Esteve, I., Gutiérrez-Corona, J. F., Reyna López, G. E., ... Tomasini, A. (2014). Mechanisms of interaction of chromium with *Aspergillus niger* var *tubingensis* strain Ed8. *Bioresource Technology*, 158, 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.036>
- Dáguer, G. P. (s.f.). Gestión de biosólidos en Colombia. Retrieved from <http://www.bvsde.paho.org/bvsaar/fulltext/biosolidos.pdf>
- Dalzell, D. J. B., Alte, S., Aspichueta, E., de la Sota, A., Etxebarria, J., Gutierrez, M., ... Christofi, N. (2002). A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. *Chemosphere*, 47(5), 535–545. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00331-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00331-9)
- Das, A., Davis, M. A., & Rudel, L. L. (2008). Identification of putative active site residues of ACAT enzymes. *Journal of Lipid Research*, 49(8), 1770–1781. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800131-JLR200>
- Das, S., Mishra, J., Das, S. K., Pandey, S., Rao, D. S., Chakraborty, A., ... Thatoi, H. (2014). Investigation on

- mechanism of Cr(VI) reduction and removal by *Bacillus amyloliquefaciens*, a novel chromate tolerant bacterium isolated from chromite mine soil. *Chemosphere*, 96, 112–121.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.080>
- De Flora, S., D'Agostini, F., Balansky, R., Micale, R., Baluce, B., & Izzotti, A. (2008). Lack of genotoxic effects in hematopoietic and gastrointestinal cells of mice receiving chromium(VI) with the drinking water. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 659(1–2), 60–67.
<https://doi.org/10.1016/J.MRREV.2007.11.005>
- Duarte, B., Silva, V., & Caçador, I. (2012). Hexavalent chromium reduction, uptake and oxidative biomarkers in *Halimione portulacoides*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 83, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2012.04.026>
- Dvorak, P. Benova, K. Vitek, J., (s.f.) Alternative Biotes on *Artemia franciscana*. University of veterinary and pharmaceutical Science, Czech Republic and Slovak republic.
- Faisal. M, & S. H. (2006). Harazdous Impact of Chromium on Environment and its Appropriate Remediations. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 1(3), 248–258.
<https://doi.org/10.3923/jpt.2006.248.258>
- Felipo, M. (1.995) Reutilización de residuos urbanos y posible contaminación. *Gestión y utilización de residuos urbanos para la agricultura*. Madrid: Editorial Aedos. 23–36.
- Fukuda, T., Ishino, Y., Ogawa, A., Tsutsumi, K., & Morita, H. (2008). Cr(VI) reduction from contaminated soils by *Aspergillus* sp. N2 and *Penicillium* sp. N3 isolated from chromium deposits. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 54(5), 295–303. <https://doi.org/10.2323/jgam.54.295>
- Gadd, G. M. (1993). Interactions of fungus with toxic metals. *New Phytologist*, 124(1), 25–60.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03796.x>
- Gantzer, C., Gaspard, P., Galvez, L., Huyard, A., Dumouthier, N., & Schwartzbrod, J. (2001). Monitoring of bacterial and parasitological contamination during various treatment of sludge. *Water Research*, 35(16), 3763–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12230157>
- Ghate, S., & Chaphekar, S. . (2000). *Plagiochasma appendiculatum* as a biotest for water quality assessment. *Environmental Pollution*, 108(2), 173–181. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00243-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00243-2)
- Gómez, S., Torres, V., García, Y., Fraga, L. M., Sarduy, L., & Savón, L. L. (2012). Comparación de modelos de efectos fijos y mixto en el análisis de un experimento con cepas mutantes de hongos celulolíticos *Trichoderma viride*. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 46(2). Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/1930/193024447002.pdf>
- Gove, L., Cooke, C. M., Nicholson, F. A., & Beck, A. J. (2001). Movement of water and heavy metals (Zn, Cu, Pb and Ni) through sand and sandy loam amended with biosolids under steady-state hydrological conditions. *Bioresource Technology*, 78(2), 171–179. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00004-9)
- Gruiz, K., Fenyvesi, É., Kriston, É., Molnár, M., & Horváth, B. (1996). Potential use of Cyclodextrins in Soil Bioremediation. In *Proceedings of the Eighth International Symposium on Cyclodextrins* (pp. 609–612). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5448-2_133

- Guillén-Jiménez, F. de M., Morales-Barrera, L., Morales-Jiménez, J., Hernández-Rodríguez, C. H., & Cristiani-Urbina, E. (2008). Modulation of tolerance to Cr(VI) and Cr(VI) reduction by sulfate ion in a *Candida* yeast strain isolated from tannery wastewater. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(11), 1277–1287. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0425-7>
- Gutiérrez Corona, J. F., Espino Saldaña, Á. E., Coreño Alonso, A., Acevedo Aguilar, F. J., Reyna López, G. E., Fernández, F. J., ... Wrobel, K. (2010). Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Amb Algal*, 1(1), 47–63. Retrieved from <http://www.ambientalex.info/revistas/Mecintcroaplbiohon.pdf>
- Hassan, S. H. A., Van Ginkel, S. W., & Oh, S.-E. (2012). Detection of Cr⁶⁺ by the Sulfur Oxidizing Bacteria Biosensor: Effect of Different Physical Factors. *Environmental Science & Technology*, 46(14), 7844–7848. <https://doi.org/10.1021/es301360a>
- Hindák, F., & Hindáková, A. (2008). Morphology and taxonomy of some rare chlorococcalean algae (Chlorophyta). *Biologia*, 63(6). <https://doi.org/10.2478/s11756-008-0099-7>
- Hlywka, J., Beck, M., Bullerman, L. (1997). The Use of the Chicken Embryo Screening Test and Brine Shrimp (*Artemia salina*) Bioassays to Assess the Toxicity of Fumonisin B1 Mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 35(10-11), 991-999.
- Horbath, B., Gruiz, K., Sara, B. (1996). Ecotoxicological testing of soil by four bacterial Biotest. Technical University of Budapest.
- Huang, G., Wang, W., & Liu, G. (2015). Simultaneous chromate reduction and azo dye decolourization by *Lactobacillus paracase* CL1107 isolated from deep sea sediment. *Journal of Environmental Management*, 157, 297–302. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.04.031>
- Ilhan, S., Cabuk, A., Filik, C., Calikan, F., (2004). Effect of pretreatment on biosorption of heavy metals by fungal biomass. *Trakya. Univ. J. Sc.*
- Ivask, A., Virta, M., Kahru, A. (2002). Construction and use of specific luminescent recombinant bacterial sensors for the assessment of bioavailable fraction of cadmium, zinc, mercury and chromium. *Soil Biol. And Biochem.* 34 (1439-1447).
- Javaid, M., & Sultan, S. (2013). Plant growth promotion traits and Cr (VI) reduction potentials of Cr (VI) resistant *Streptomyces* strains. *Journal of Basic Microbiology*, 53(5), 420–428. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200032>
- Kang, C.-H., Kwon, Y.-J., & So, J.-S. (2016). Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures. *Ecological Engineering*, 89, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.023>
- Kasemets, K., Ivask, A., Dubourguier, H.-C., & Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in Vitro*, 23(6), 1116–1122. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.015>
- Kavita, B., & Keharia, H. (2012). Reduction of hexavalent chromium by *Ochrobactrum intermedium* BCR400 isolated from a chromium-contaminated soil. *3 Biotech*, 2(1), 79–87. <https://doi.org/10.1007/s13205-011-0038-0>
- Khambhaty, Y., Mody, K., Basha, S., & Jha, B. (2009). Biosorption of Cr(VI) onto marine *Aspergillus niger*:

- experimental studies and pseudo-second order kinetics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(8), 1413–1421. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0028-0>
- Kotaś, J., & Stasicka, Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution*. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00168-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00168-2)
- Ksheminska, H., Honchar, T., Gayda, G., & Gonchar, M. (2006). Extra-cellular chromate-reducing activity of the yeast cultures. *Open Life Sciences*, 1(1), 137–149. <https://doi.org/10.2478/s11535-006-0009-3>
- Kumral, E. (2007). “Speciation of Chromium in Waters Via Sol-Gel Preconcentration Prior To Atomic Spectrometric Determination”. master degree in chemistry, (July).
- Labunska, I., Brigden, K., Johnston, R., Santillo, P., & Ashton, D. &. (n.d.). Identificación y trascendencia ambiental de contaminantes orgánicos y metales pesados asociados con la curtiembre Arlei S.A., Las Toscas, Provincia de Santa Fe, Argentina 2000. Retrieved from <http://www.greenpeace.org/argentina/Global/argentina/report/2006/4/identificaci-n-y-trascendencia-2.pdf>
- Lackner, M., Najafzadeh, M. J., Sun, J., Lu, Q., & Hoog, G. S. de. (2012). Rapid identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* strains by using rolling circle amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 126–33. <https://doi.org/10.1128/AEM.05280-11>
- Lee, D.-J., Tay, J.-H., Hung, Y.-T., & He, P. J. (2005). Introduction to Sludge Treatment. In *Physicochemical Treatment Processes* (pp. 677–703). Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-820-x:677>
- Lewis, B., Levering, D. (2004). A high-level disinfection standard for land-applied sewage sludges (biosolids). Retrieved March 4, 2018, from <https://www.thefreelibrary.com/Lewis%2c+David+Levering-a195>
- Lovley, D. R. (1995). Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction. *Journal of Industrial Microbiology*, 14(2), 85–93. <https://doi.org/10.1007/BF01569889>
- Mahmoud, M. E., Yakout, A. A., Abdel-Aal, H., & Osman, M. M. (2015). Speciation and Selective Biosorption of Cr(III) and Cr(VI) Using Nanosilica Immobilized-Fungi Biosorbents. *Journal of Environmental Engineering*, 141(4), 4014079. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000899](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000899)
- Mandal, K., Singh, B., Jariyal, M., & Gupta, V. K. (2014). Bioremediation of fipronil by a *Bacillus firmus* isolate from soil. *Chemosphere*, 101, 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.043>
- McDougall, W. B. (1916). The Growth of Forest Tree Roots. *American Journal of Botany*, 3(7), 384. <https://doi.org/10.2307/2435018>
- Megharaj, M., Avudainayagam, S., & Naidu, R. (2003). Toxicity of Hexavalent Chromium and Its Reduction by Bacteria Isolated from Soil Contaminated with Tannery Waste. *Current Microbiology*, 47(1), 51–54. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3889-0>
- Montauban-González, R. (2013). Determinación de Cromo(III) y Cromo (VI) mediante técnicas electroquímicas de análisis, 2(III), 1–118.
- Mora Collazos, A. (2016). *Bacillus* sp. G3 un microorganismo promisorio en la biorremediación de aguas

- industriales contaminadas con cromo hexavalente. *Nova Scientia*, 8(17), 361.
<https://doi.org/10.21640/ns.v8i17.655>
- Morales-Barrera, L., & Cristiani-Urbina, E. (2007). Hexavalent Chromium Removal by a *Trichoderma inhamatum* Fungal Strain Isolated from Tannery Effluent. *Water, Air, and Soil Pollution*, 187(1–4), 327–336. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9520-z>
- Nendza, M. (2002). Inventory of marine biotest methods for the evaluation of dredged material and sediments. *Chemosphere*, 48(8), 865–883. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00003-6)
- Nepomuscene, N. J., Daniel, D., & Krastanov, A. (2007). Biosensor to detect chromium in wastewater. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 21(3), 377–381.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2007.10817477>
- Nguyen-nhu, N. T., & Knoops, B. (2002). Alkyl hydroperoxide reductase 1 protects *Saccharomyces cerevisiae* against metal ion toxicity and glutathione depletion. *Toxicology Letters*, 135(3), 219–228.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00280-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00280-1)
- Nicolotti, G., & Egli, S. (1998). Soil contamination by crude oil: impact on the mycorrhizosphere and on the revegetation potential of forest trees. *Environmental Pollution*, 99(1), 37–43.
[https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(97\)00179-6](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(97)00179-6)
- Niculescu, M., Dana Ionita, A., & Filipescu, L. (2010). București) 61 Nr. *REV. CHIM*, 2. Retrieved from <http://www.revistadechimie.ro200>
- Niculescu, M., Dana Ionita, A., & Filipescu, L. (2010). București) ♦ 61♦ Nr. *REV. CHIM*, 2. Retrieved from <http://www.revistadechimie.ro200>
- Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance, 730–750.
- Overcash, M. R., Sims, R. C., Sims, J. L., Nieman, K. C., Overcash, M. R. ;, Sims, R. C. ;, ... Nieman, C. (2005). Beneficial Reuse and Sustainability: The Fate of Organic Compounds in the Land-Applied Waste Recommended Citation Beneficial Reuse and Sustainability: The Fate of Organic Compounds in Land-Applied Waste. Retrieved from http://digitalcommons.usu.edu/bioeng_facpub
- Pan, X., Liu, Z., Chen, Z., Cheng, Y., Pan, D., Shao, J., ... Guan, X. (2014). Investigation of Cr(VI) reduction and Cr(III) immobilization mechanism by planktonic cells and biofilms of *Bacillus subtilis* ATCC-6633. *Water Research*, 55(Vi), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.066>
- Panda, S. K., & Choudhury, S. (2005). Chromium stress in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 95–102. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100008>
- Pillichshammer, M., Pompel, T., Powder, R., Eller, K., Klima, J., & Schinner, F. (1995). Biosorption of chromium to fungi. *Biometals*, 8(2), 117–121. <https://doi.org/10.1007/BF00142010>
- Ratto, C. M. & L. M. (2000)). Metales pesados por aplicacion de biosolidos en un hapludol de tucuman, republica Argentina ... Retrieved March 3, 2018, from https://www.researchgate.net/publication/237756197_
- Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., & Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *BioMetals*, 21(3), 321–332.

<https://doi.org/10.1007/s10534-007-9121-8>

- Ramírez-Ramírez, R., Calvo-Méndez, C., Ávila-Rodríguez, M., Lappe, P., Ulloa, M., Vázquez-Juárez, R., & Félix Gutiérrez-Coron, J. (2004). Cr(VI) reduction in a chromate-resistant strain of *Candida maltosa* isolated from the leather industry. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85(1), 63–68.
<https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020151.22858.7f>
- Reish, D., Oshida, O. (1987). Manual of Methods in aquatic environment research. Part 10. Short-term static bioassays . FAO, Rome *Fisheries Technical Paper* (247), pp 62.
- Sandana Mala, J. G., Sujatha, D., & Rose, C. (2015). Inducible chromate reductase exhibiting extracellular activity in *Bacillus methylotrophicus* for chromium bioremediation. *Microbiological Research*, 170, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.06.001>
- Schmidt, B., Schafer, A. (2012). Development of a system to investigate the contamination level in soils by use of collembola as bioindicators. Aachen University. Thailand
- Schnoor, J. L. (n.d.). Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center. Retrieved from https://clu-in.org/download/toolkit/phyto_e.pdf
- Semra Ilhan, Cansu Filik, Ahmet Çabuk, F. C. (2004). Effect of pretreatment on biosorption of heavy metals by fungal biomass (PDF Download Available). Retrieved February 24, om https://www.researchgate.net/publication/268186503_Effect_of_pretreatment_on_biosorption_of_heavy_metals_by_fungal_biomass
- Semra Ilhan, Cansu Filik, Ahmet Çabuk, F. C. (2004). Effect of pretreatment on biosorption of heavy metals by fungal biomass (PDF Download Available). Retrieved February 24, 2018, from https://www.researchgate.net/publication/268186503_Effect_of_pretreatment_on_biosorption_of_heavy_metals_by_fungal_biomass
- Seoáñez Calvo, M., & Gutiérrez de Ojesto, A. (1999). *Agua residual : tratamiento por humedales artificiales : fundamentos científicos : tecnologías : diseño*. Mundi-Prensa.
- Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., & Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.02.003>
- Sharma, S., & Adholeya, A. (2012). Hexavalent Chromium Reduction in Tannery Effluent by Bacterial Species Isolated from Tannery Effluent Contaminated Soil. *Journal of Environmental Science and Technology*, 5(3), 142–154. <https://doi.org/10.3923/jest.2012.142.154>
- Sharma, S., & Malaviya, P. (2016). Bioremediation of tannery wastewater by chromium resistant novel fungal consortium. *Ecological Engineering*, 91, 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.03.005>
- Silva, J., Torrejón, G., Bay-Schmith, E., & Larrain, A. (n.d.). Calibration of the acute toxicity bioassay with *daphnia pulex* (crustacea: cladocera) using a reference toxicant. Retrieved from <https://scielo.conicyt.cl/pdf/gayana/v67n1/art11.pdf>
- Singh, N., Verma, T., & Gaur, R. (2013). Detoxification of hexavalent chromium by an indigenous facultative anaerobic *Bacillus cereus* strain isolated from tannery effluent. *African Journal of Biotechnology*, 12(10),

1091–1103. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1636>

- Singh, R., Dong, H., Liu, D., Zhao, L., Marts, A. R., Farquhar, E., ... Briggs, B. R. (2016). Reduction of hexavalent chromium by the thermophilic methanogen *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 148, 442–456. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2014.10.012>. Reduction
- Smith, S. R. (2009). A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. *Environment International*, 35(1), 142–56. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.06.009>
- Stein, K., & Schwedt, G. (1994a). Speciation of chromium in the waste water from a tannery. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 350(1–2), 38–43. <https://doi.org/10.1007/BF00326250>
- Sumner, E. R., Shanmuganathan, A., Sideri, T. C., Willetts, S. A., Houghton, J. E., & Avery, S. V. (2005). Oxidative protein damage causes chromium toxicity in yeast. *Microbiology*, 151(6), 1939–1948. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27945-0>
- Tait, K., Sayer, J. A., Gharieb, M. M., & Gadd, G. M. (1999). Fungal production of calcium oxalate in leaf litter microcosms. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(8), 1189–1192. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00008-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00008-5)
- Tejeda-Benitez, L., Flegel, R., Odigie, K., & Olivero-Verbel, J. (2016). Pollution by metals and toxicity assessment using *Caenorhabditis elegans* in sediments from the Magdalena River, Colombia. *Environmental Pollution*, 212, 238–250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.057>
- Telles-Mosquera, J., Carvajal, R., Gaitan, A. (2004). Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización del cromo en el proceso productivo de curtiembres. Retrieved March 3, 2018, from http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=29604&id_seccion=1979&id_ejemplar=3035&id_revista=121
- Tenenbaum, D. (1997). The beauty of biosolids. *Environmental Health Perspectives*, 105(1), 32–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9074877>
- Tewari, N., Vasudevan, P., & Guha, B. K. (2005). Study on biosorption of Cr(VI) by *Mucor hiemalis*. *Biochemical Engineering Journal*, 23(2), 185–192. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2005.01.011>
- Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Rath, B. P., & Das, N. (2014). Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review. *Journal of Environmental Management*, 146, 383–399. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.014>
- Tigini, V., Bevione, F., Prigione, V., Poli, A., Ranieri, L., Spennati, F., ... Varese, G. C. (2018). Tannery mixed liquors from an ecotoxicological and mycological point of view: Risks vs potential biodegradation application. *Science of The Total Environment*, 627, 835–843. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.01.240>
- Torres, P. L., Parra, C. A. M., & Puentes, G. V. M. (2008). Estabilización alcalina de biosólidos compostados de plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas para aprovechamiento agrícola. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 61(1), 4432–4444. Retrieved from <http://www.redalyc.org/exportar cita. oa? id=179914077019>
- Tortorelli, M.; H. D. (n.d.). Descripción de un protocolo estandarizado de toxicidad aguda para cladóceros

(página 2) - Monografias.com. Retrieved February 23, 2018, from
<http://www.monografias.com/trabajos11/clado/clado2.shtml>

- Trottier, S., Blaise, C., Kusui, T., & Johnson, E. M. (1997). Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 12(3), 265–271. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2256\(1997\)12:3<265::AID-TOX10>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2256(1997)12:3<265::AID-TOX10>3.0.CO;2-9)
- Turdean, G. (2011) Design and Development of Biosensors for the Detection of Heavy Metal Toxicity. *International Journal of Electrochemistry Physical Chemistry* Department Babes Bolyai, University Napoca, Romania.
- Truong, P. (2005). Application of the Vetiver system phytoremediation of mercury pollution in the lake and Yolo counties, northern California.
- US Environmental Protection Agency (EPA) (1993) A Guide to the Biosolids. Risk Assessments for the EPA Part 503 Rule.
- US Environmental Protection Agency EPA (2002) Nomination guidance biosolids exemplary. Management awards programs for operating projects, Technology Development Research and Public Acceptance.
- US Environmental Protection Agency EPA (2003) Progress Report. Metal biosensors. Development and environmental testing.
- US Environmental Protection Agency (EPA) (2012) Leyes y Normas: el proceso de reglamentación: EPA en español.
- Verce, M. F., Stiles, A. R., Chong, K. C., & Terry, N. (2012). Isolation of an extremely boron-tolerant strain of *Bacillus firmus*.: EBSCOhost. <https://doi.org/10.1139/W2012-049>
- Verma, J. P., Yadav, J., Tiwari, K. N., . L., & Singh, V. (2010). Impact of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Crop Production. *International Journal of Agricultural Research*, 5(11), 954–983. <https://doi.org/10.3923/ijar.2010.954.983>
- Verma, T., Garg, S. K., & Ramteke, P. W. (2009). Genetic correlation between chromium resistance and reduction in *Bacillus brevis* isolated from tannery effluent. *Journal of Applied Microbiology*, 107(5), 1425–1432. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04326.x>
- Villegas, L. B., Fernández, P. M., Amoroso, M. J., & de Figueroa, L. I. C. (2008). Chromate removal by yeasts isolated from sediments of a tanning factory and a mine site in Argentina. *BioMetals*, 21(5), 591–600. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9145-8>
- Violante, A., Cozzolino, V., Perelomov, L., Caporale, A. ., & Pigna, M. (2010). Mobility and Bioavailability of Heavy Metals and Metalloids in Soil Environments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3), 268–292. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000100005>
- Viti, C., Pace, A., & Giovannetti, L. (2003). Characterization of Cr(VI)-Resistant Bacteria Isolated from Chromium-Contaminated Soil by Tannery Activity. *Current Microbiology*, 46(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3800-z>
- Viti, C., Pace, A., & Giovannetti, L. (2003). Characterization of Cr(VI)-Resistant Bacteria Isolated from

Chromium-Contaminated Soil by Tannery Activity. *Current Microbiology*, 46(1), 1–5.

Xu, W., Liu, Y., Zeng, G., Zhou, M., Fan, T., Wang, X., & Xia, W. (2009). Speciation of chromium in soil inoculated with Cr(VI)-reducing strain, *Bacillus* sp. XW-4. *Journal of Central South University of Technology*, 16(2), 253–257. <https://doi.org/10.1007/s11771-009-0043-1>

Yang, H., & Wang, H. Z. (2013). Adsorption of Nickel and Cobalt Ions on Magnesium Silicate. *Advanced Materials Research*, 726–731, 2855–2858. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.726-731.2855>

Zeraatkar, A. K., Ahmadzadeh, H., Talebi, A. F., Moheimani, N. R., & McHenry, M. P. (2016). Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. *Journal of Environmental Management*. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.06.059>

Zhang, K., Chen, Q., Luo, H. B., & Li, X. T. (2014). Accumulation of Chromium in *Vetiveria zizanioides* Assisted by Earthworm in Contaminated Soil. *Advanced Materials Research*, 989–994, 1313–1318. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.989-994.1313>

Estrategias biotecnológicas para evaluar la presencia de cromo en la generación de biosólidos seguros.

- . Posibles alternativas de bioremediación.